



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Hippeastrum puniceum*  
(Lam.) Kuntze (Amaryllidaceae)**

**LETÍCIA CARLESSO SOPRANI**

**VITÓRIA**

**2017**



Letícia Carlesso Soprani

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Hippeastrum puniceum*  
(Lam.) Kuntze (Amaryllidaceae)**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas do Centro de  
Ciências da Saúde da Universidade  
Federal do Espírito Santo como  
requisito parcial para obtenção do  
título de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Masrouah Jamal

VITÓRIA

2017

**Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes**

**(Isaac Newton)**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela vida, sabedoria e por conduzir meu caminho até aqui. Por me permitir crescer e aprender sem perder a fé;

Aos meus pais e ao meu irmão, Neuza e Pedro e Bruno, meus maiores incentivadores, por acreditarem sempre em mim e por dedicarem suas vidas para me abençoar no crescimento intelectual e pessoal;

À professora Dr<sup>a</sup>. Claudia M. Jamal pela oportunidade, orientação, confiança e dedicação, apoio e atenção, por acreditar em meu potencial e o deste trabalho, pelo conhecimento e paciência a mim fornecidos;

Ao Professor Dr. Warley Souza Borges, pelo suporte no trabalho durante maior parte da minha pesquisa, confiança, credibilidade e por me acolher no Laboratório de Produtos Naturais;

Aos meus amigos do laboratório, Andressa, Carol, Marquinhos, Dudu, Karla, Amanda, Luisa, Carliani, Vanessa, David e Jean pelos momentos de descontração e pelo grande aprendizado compartilhado dentro do laboratório, os quais foram fundamentais para realização deste mestrado. Tornaram mais leve, agradável e prazeroso o dia a dia de trabalho. Em especial, ao Jean, pela grande ajuda nesta pesquisa, pela ajuda e pelos conselhos e conhecimentos compartilhados;

Aos colegas do programa do mestrado, em especial Kainá, Augusto, Igor, pelo companheirismo e suporte emocional e pela companhia quase sempre agradável;

Ao professor Dr. Anderson Alves Araújo pela coleta e identificação da planta estudada;

Ao Professor Dr. Jaume Bastida por possibilitar a comparação com a biblioteca de alcaloides de Amaryllidaceae, pelo auxílio no conhecimento de análises de

Ressonância Magnética Nuclear ao compartilhar seu vasto conhecimento sobre alcaloides de Amaryllidaceae;

Ao professor Dr. Rodrigo Kitagawa por possibilitar a realização das análises biológicas antioxidantes;

Aos Professores Dr. Marcelo Antonio de Oliveira e Dr. Hildegardo Seibert Franca pelas sugestões para o aprimoramento do trabalho durante participação na banca de qualificação;

Ao laboratório de RMN do NCQP-UFES em especial ao Professor Dr. Álvaro Cunha Neto e Júlia Leite pelas análises de RMN;

Ao laboratório de Espectrometria de Massas da UFES Alegre e São Mateus pelas análises de CG-EM;

Aos amigos Suellen, Lilian, Laryssa, Leandra, Martielo, Glaucinha, Lara, Antônio, Tamiris, Matheus, Natwrie, Vitor, Lindamara, Nicole, Marina e Lara pelos momentos de descontração, pelas gargalhadas, pelas orações, pelo apoio e incentivo de sempre; à Mara, pois sem seus conselhos e fé eu não teria concluído esta etapa;

À CAPES pelo incentivo à pesquisa e pelo incentivo financeiro;

Ao programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela formação,  
Obrigada!

## RESUMO

*Hippeastrum puniceum*, é uma espécie pertencente à família Amaryllidaceae. Esta apresenta um grupo bem específico de alcaloides, conhecidos como alcaloides de Amaryllidaceae, que pertencem ao grupo dos isoquinolínicos, os quais possuem diversas atividades biológicas, tais como: atividade antioxidante, inibição da enzima acetilcolinesterase, ação antiviral, antifúngica, antiparasitária, dentre outras. Este trabalho teve como objetivo estudar a composição química dos bulbos da espécie *Hippeastrum puniceum* (Lam.) Kuntz., bem como avaliar as possíveis atividades biológicas dessa espécie. Foi realizada extração ácido-base para o extrato metanólico de bulbos de *H. puniceum* (HpEb), sendo obtidas 03 outras frações: Hp01 (Hexano), Hp02 (Acetato de Etila) e Hp03 (Acetato de Etila:Metanol 3:1). Estas foram submetidas a técnicas clássicas de fracionamento e purificação. Foram determinadas também, as atividades antioxidante frente aos radicais sintéticos DPPH e ABTS; e a trombolítica *in vitro*, que avaliou a capacidade de os extratos promoverem lise de coágulos. As análises dos extratos por CG-EM mostraram a presença de 11 alcaloides, sendo estes a 9-O-desmetillicoramina, licoramina, galantamina, assoanina, kirkina, 8-desmetilmaritidina, pancratinina, 11-hidroxivittatina, pseudolicorina, 2α-hidroxihomolicorina e licorina. Foram isolados, por meio de técnicas cromatográficas clássicas de isolamento e purificação os alcaloides 9-O-desmetillicoramina, 9-desmetil-2α-hidroxihomolicorina, tazetina e licorina. Não foi observada atividade trombolítica nos extratos de *H. puniceum*. As frações HpEb, Hp02 e Hp03 apresentaram capacidade antioxidante, contudo, a que apresentou maior atividade foi Hp02. Esta também apresentou maior concentração de alcaloides. Os resultados obtidos mostram o progresso no estudo fitoquímico de *Hippeastrum puniceum*, no entanto se faz necessária a busca de outras metodologias para avaliar o potencial biológico desta espécie.

**Palavras-chave:** Amaryllidaceae; *Hippeastrum puniceum*; antioxidante; trombolítico; alcaloides.

## ABSTRACT

*Hippeastrum puniceum* is a specie that belongs to Amaryllidaceae This family presents a very specific group of alkaloids known as Amaryllidaceae alkaloids, (group of isoquinoline alkaloids), showing several biological activities such as antioxidant activity, inhibition of the enzyme acetylcholinesterase, antiviral action, antifungal, antiparasitic, and others. The purpose of this work was to study the chemical composition of the bulbs of the species *Hippeastrum puniceum* (Lam.) Kuntz., and evaluate the possible biological activity. The acid-base extraction was performed for the methanolic extract of *H. puniceum* bulbs, obtaining 03 other fractions: Hp01 (Hexan), Hp02 (Ethyl Acetate) e Hp03 (Ethyl Acetate:Methanol 3:1). Then were used classics techniques of fractionation and purification. Tests were performed to evaluate the antioxidant activity against the synthetic radical DPPH and ABTS, as well as the determination of *in vitro* thrombolytic activity that evaluated the capacity of the extracts promote clot lysis. Analysis of the extracts by GC-MS revealed the presence of 11 alkaloids: 9-O-demethyllicoramine, licoramine, galantamine, assoanine, kirkine, 8-demethylmaritidine, pancratinine, 11-hydroxyvittatine, pseudolicorine, 2 $\alpha$ -hydroxyhomolycorine and licorine. They were isolated by standard techniques of isolation and purification of the alkaloids 9-O-demethyllycoramine, 9-demethyl-2 $\alpha$ -hydroxyhomolycorine, licorine and tazettine. The fractions HpEb, Hp02 and Hp03 showed antioxidant capacity. The results obtained demonstrate the progress in the phytochemical study of *Hippeastrum puniceum*. However it is necessary to search for other methodologies to evaluate the biological potential of this species.

**Keywords:** Amaryllidaceae; *Hippeastrum puniceum*; alkaloids, antioxidant; thrombolytic.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática das moléculas de (1) morfina, (2) quinina e (3) estriquinina respectivamente (PINTO et al., 2002). .....	15
Figura 2: Representação da síntese de norbeladina. Fonte: BASTIDA, 2006..	17
Figura 3: Representação dos tipos de esqueletos de alcaloides de Amaryllidaceae.....	18
Figura 4: Acoplamento fenol oxidativo em alcaloides de Amaryllidaceae .....	19
Figura 5: <i>Hippeastrum puniceum</i> (Lam.) Kuntze. (AMARAL, 2007). .....	25
Figura 6: Processo de extração ácido-base do metanólico dos bulbos de <i>H. puniceum</i> .....	32
Figura 7: <i>Fracionamento de Hp02</i> . .....	34
Figura 8: Ilustração esquemática da redução do radical DPPH por um composto antioxidante (AH) (PYRZYNSKA E PEKAL, 2013). .....	43
Figura 9: Estrutura química do TROLOX.....	43
Figura 10: Estabilização do radical ABTS <sup>•+</sup> por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio. ....	44
Figura 11: Estrutura dos alcaloides encontrados em <i>Hippeastrum puniceum</i> ..	49
Figura 12: Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto <b>1</b> (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz). .....	51
Figura 13: Estrutura química da licorina.....	52
Figura 14: Espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto <b>2</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) .....	53
Figura 15: Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H do composto <b>2</b> (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	54



Figura 16: Ampliação do espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>2</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	54
Figura 17: Estrutura da 9-O-desmetil-2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina. ....	55
Figura 18: Espectro de RMN $^1\text{H}$ do composto <b>3</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). ....	56
Figura 19: Ampliação do espectro de RMN $^1\text{H}$ na região de 2,5 a 1,5 ppm do composto <b>3</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). ....	57
Figura 20: Estrutura da 9-O-desmetillicoramina. ....	58
Figura 21: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto <b>4</b> ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz). ....	60
Figura 22: Estrutura da tazetina .....	61
Figura 23: Resultado de captura do radical DPPH por HpEb, Hp01, Hp02, Hp03 e TROLOX.....	63
Figura 24: Representação da média da porcentagem de inibição dos resultados dos ensaios de captura do radical ABTS. ....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Respresentação dos eluentes utilizados na CLV. ....	35
Tabela 2: representação dos eluentes utilizados na coluna cromatográfica 1. ....	37
Tabela 3: Sistema de solventes utilizado na coluna cromatográfica 2. ....	39
Tabela 4: Classes químicas detectadas no extrato bruto de <i>Hippeastrum puniceum</i> .....	47
Tabela 5: Dados de CG-EM de <i>Hippeastrum puniceum</i> .....	48
Tabela 6: Dados de RMN <sup>1</sup> H do composto <b>1</b> comparados com a literatura (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) (BASTIDA, 2006) .....	51
Tabela 7: Dados de RMN <sup>1</sup> H do composto <b>2</b> comparados com a literatura (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz) (BASTIDA, 2006) .....	55
Tabela 8: Comparação entre os deslocamentos químicos do composto <b>3</b> com os deslocamentos de 9-O-desmetillicoramina (KIHARA et al, 1991) .....	58
Tabela 9: Deslocamentos dos hidrogênios em ppm do composto <b>4</b> , e do alcaloide tazetina.....	61
Tabela 10: Dados da porcentagem de inibição dos extratos em diferentes concentrações no ensaio de captura do radical DPPH .....	63
Tabela 11: Dados da porcentagem de inibição dos extratos em diferentes concentrações no ensaio de captura do radical ABTS.....	64
Tabela 12: Resultado da avaliação da atividade trombolítica.....	66

## LISTA DE SIGLAS

ABTS – 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

ANOVA – Análise de variância

l – largo

CCD – cromatografia em camada delgada

CD<sub>3</sub>OD – metanol deuterado

CDCl<sub>3</sub> – clorofórmio deuterado

CE<sub>50</sub> – concentração eficaz 50%

CG-EM – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CLV – cromatografia líquida a vácuo

d – duplete

dd – duplo duplete

ddd – duplo duploduplete

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazina

Hz – hertz

m – multiplete

m/z – massa/carga

Me – metila

MHz – mega hertz

q – quadruplete

RMN – ressonância magnética nuclear

RMN <sup>1</sup>H – ressonância magnética nuclear de hidrogênio

s – sinpleto

td – triplo duplete

UV – ultravioleta

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	14
1.2 FAMÍLIA AMARYLLIDACEAE.....	15
1.3 ALCALOIDES DE AMARYLLIDACEAE .....	16
1.4 HIPPEASTRUM .....	21
1.5 A ESPÉCIE ESTUDADA: <i>Hippeastrum puniceum</i> .....	24
2 OBJETIVOS .....	27
2.1 GERAL.....	27
2.2 ESPECÍFICOS.....	27
3 MÉTODOS .....	28
3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL .....	28
3.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO (HpEB).....	28
<b>3.3.1 Alcaloides</b> .....	29
<b>3.3.2 Flavonoides</b> .....	29
<b>3.3.3 Saponinas</b> .....	29
<b>3.3.4 Triterpenos e Esteróides</b> .....	30
<b>3.3.5 Taninos</b> .....	30
<b>3.3.6 Cumarinas</b> .....	30
<b>3.3.7 Antraquinonas</b> .....	31
3.4 EXTRAÇÃO ÁCIDO-BASE .....	31
3.5 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE <i>H. puniceum</i> .....	32
<b>3.5.1 Fracionamento de Hp01</b> .....	33
<b>3.5.2 Fracionamento de Hp02</b> .....	33
3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TROMBOLÍTICA .....	41
3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	42

3.7.1 Atividade inibitória do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH <sup>•</sup> ) .....	42
3.7.2 Atividade inibitória do radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS <sup>•+</sup> ) .....	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	46
4.1 PERFIL QUÍMICO .....	46
4.1.1 Rendimento do extrato bruto .....	46
4.1.2 Triagem fitoquímica preliminar do extrato metanólico .....	46
4.2 ANÁLISE DO EXTRATO POR CROMATOGRAFIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM) .....	47
4.3 IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPONENTES QUÍMICOS ISOLADOS DE <i>HIPPEASTRUM PUNICEUM</i> .....	49
4.3.1 Composto 1 .....	50
4.3.2 Composto 2 .....	53
4.3.3 Composto 3 .....	56
4.3.4 Composto 4 .....	59
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	62
4.4.1 Ensaio de captura do radical DPPH .....	62
4.4.2 Ensaio de captura do radical ABTS .....	64
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TROMBOLÍTICA .....	66
CONCLUSÃO .....	68
REFERÊNCIAS .....	69
ANEXO – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP .....	78

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 PRODUTOS NATURAIS

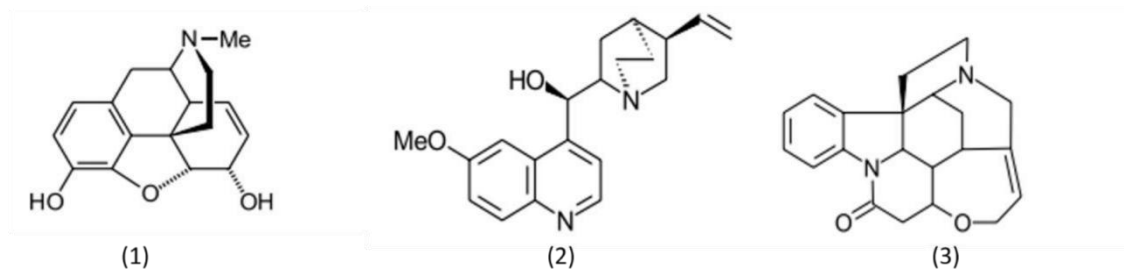
O homem sempre utilizou espécies vegetais para diversas finalidades, dentre elas, alimentação, unguentos e óleos, em cerimônias festivas ou religiosa, venenos contra presas e inimigos, corantes, bálsamos, para o tratamento e cura de enfermidades - esta prática vigora até os dias atuais (NOGUEIRA et al., 2009; BARREIRO e BOLZANI, 2009).

As plantas produzem metabólitos primários e secundários. São considerados metabólitos primários as substâncias essenciais para promover a vida celular, os quais são produzidos diretamente a partir da via respiratória ou fotossíntese, dentre estes são encontrados as proteínas, lipídeos, carboidratos, ácidos nucleicos e aminoácidos. Os metabólitos secundários são compostos gerados a partir dos metabólitos primários em rotas metabólicas diversas. Estes estão relacionados com muitas funções, podendo agir como atrativos para polinização, como proteção contra estresses bióticos contra o ataque de patógenos e de herbívoros e também pode ser utilizado como princípios ativos para medicamentos (SIMÕES, 2002; DELBONE, 2010).

Dentre os metabólitos secundários encontram-se compostos fenólicos, alcaloides, terpenos, saponinas, antraquinonas, dentre outros (DELBONE, 2010). Mesmo estando presentes em quantidades mínimas, esses são os principais responsáveis pelas atividades biológicas apresentadas pelas plantas ou também podem ser matérias-primas essenciais para a produção de novos compostos (GURIB-FAKIM, 2006; STROHL, 2000; BARREIRO E BOLZANI, 2009). A riqueza da flora brasileira e sua potencialidade como fonte de substâncias úteis são fatores que fazem com que o interesse em produtos naturais seja cada vez maior (PINTO, et al., 2002; KATO, 2001).

No século XIX ocorreu o isolamento das primeiras substâncias do reino vegetal. É desta época o isolamento de morfina (1804), quinina e estriquinina (1820), Figura 1 (PINTO et al, 2002; VIEGAS et al 2006). As primeiras

substâncias isoladas, foram alcaloides, os quais são produtos do metabolismo secundário das plantas.



**Figura 1:** Representação esquemática das moléculas de (1) morfina, (2) quinina e (3) estriquinina respectivamente (PINTO et al., 2002).

Isolada da planta *Papaver somniferum* em 1804 pelo farmacêutico alemão Friedrich Wilhelm Adam, a morfina possui ação analgésica sendo utilizada até os dias atuais, segundo recomendação da Organização Mundial de Saúde (OMS), para tratamento da dor intensa especialmente em pacientes terminais com câncer. A quinina, isolada a partir da planta *Cinchona ledgeriana*, possui indicação terapêutica como antimalárico (BARREIRO E BOLZANI, 2009). A estriquinina é um alcalóide muito tóxico, que já fora utilizado como pesticida e é extraída de *Nux vômica* (PINTO et al, 2002).

As pessoas tem se preocupado cada vez mais em utilizar produtos de origem vegetal como uma opção terapêutica para várias doenças (SIMÕES, SCHENKEL, 2002; VIEGAS et al, 2006; GURIB-FAKIM, 2006).

## 1.2 FAMÍLIA AMARYLLIDACEAE

A família Amaryllidaceae pertence à classe das monocotiledôneas e é encontrada em regiões temperadas e quentes, possuindo grande diversidade na África do Sul e na região dos Andes (BASTIDA et al, 2011). Esta família apresenta plantas bulbosas e são empregadas também para fins de paisagismo e ornamentação, devido à beleza das suas flores (AMARAL, 2007;

de ANDRADE, 2012). Amaryllidaceae representa três subfamílias, 73 gêneros e 1605 espécies, sendo que no Brasil encontra-se distribuída por todo território, no qual foram identificados 18 gêneros e 135 espécies de Amaryllidaceae (CANDIDO et al, 2013; DUTILH e OLIVEIRA, 2016). Em 2009, CHASE, REVEAL e FAY propuseram a união das famílias Alliaceae, Agapanthaceae e Amaryllidaceae em uma única família denominada Amaryllidaceae com as consequentes subfamílias Allioideae, Agapanthoideae e Amaryllidoideae, respectivamente. E atualmente ainda se utiliza o nome Amaryllidaceae para se referir às espécies da subfamília Amaryllidoideae.

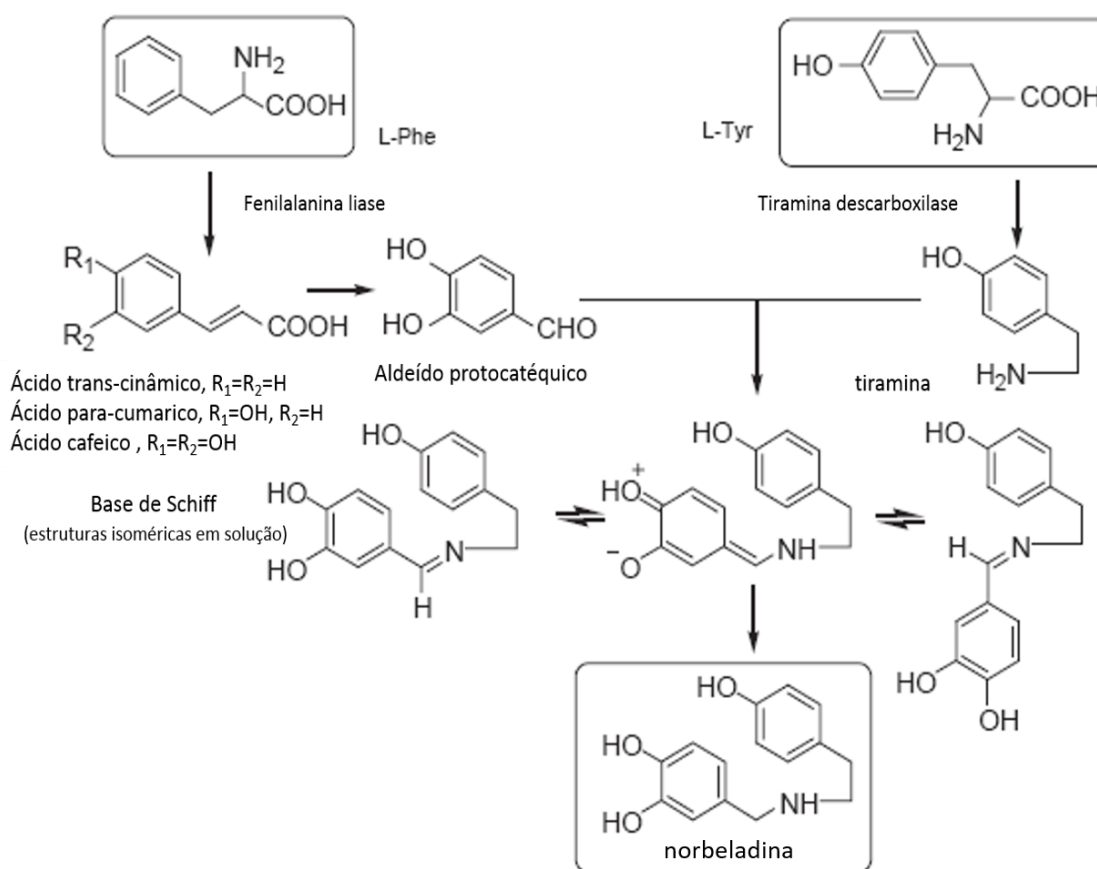
A família das Amaryllidaceae é conhecida desde a antiguidade pela utilização de seus exemplares para fins medicinais, tais como: no tratamento de doenças urinárias ou venéreas; febre; inchaços; como estimulante sexual; em problemas gastrointestinais e respiratórios; dores de cabeça; poliomielite; reumatismo; dor de ouvido; Alzheimer; dentre outros. E ainda hoje é empregada em regiões africanas e americanas (LORENZI e MATOS, 2002; ELGORAGHI et al 2004; FENG et al, 2011; BERKOV et al, 2011; de ANDRADE, 2012;). Em um estudo de 2013, as Amaryllidaceae estavam entre as 20 famílias de plantas mais utilizadas com fins terapêuticos, sendo que suas atividades se devem à presença de alcaloides (JIN, 2013).

### 1.3 ALCALOIDES DE AMARYLLIDACEAE

Alcaloides são produtos biossintetizados pelos vegetais em detrimento a algum aspecto ecológico e/ou evolutivo, tendo como uma de suas principais funções a proteção do espécime vegetal e a defesa contra possíveis predadores. São substâncias que possuem no mínimo um átomo de nitrogênio em sua composição que é derivado do metabolismo de aminoácidos (DEMAIN e FANG, 2000; MANACH et al, 2004; GURIB-FAKIM, 2006; BESSA et al, 2016). Os alcaloides são metabólitos secundários com distribuição restrita na natureza, e são considerados os principais componentes associados aos efeitos farmacológicos encontrados nessas plantas (JIN, 2009).



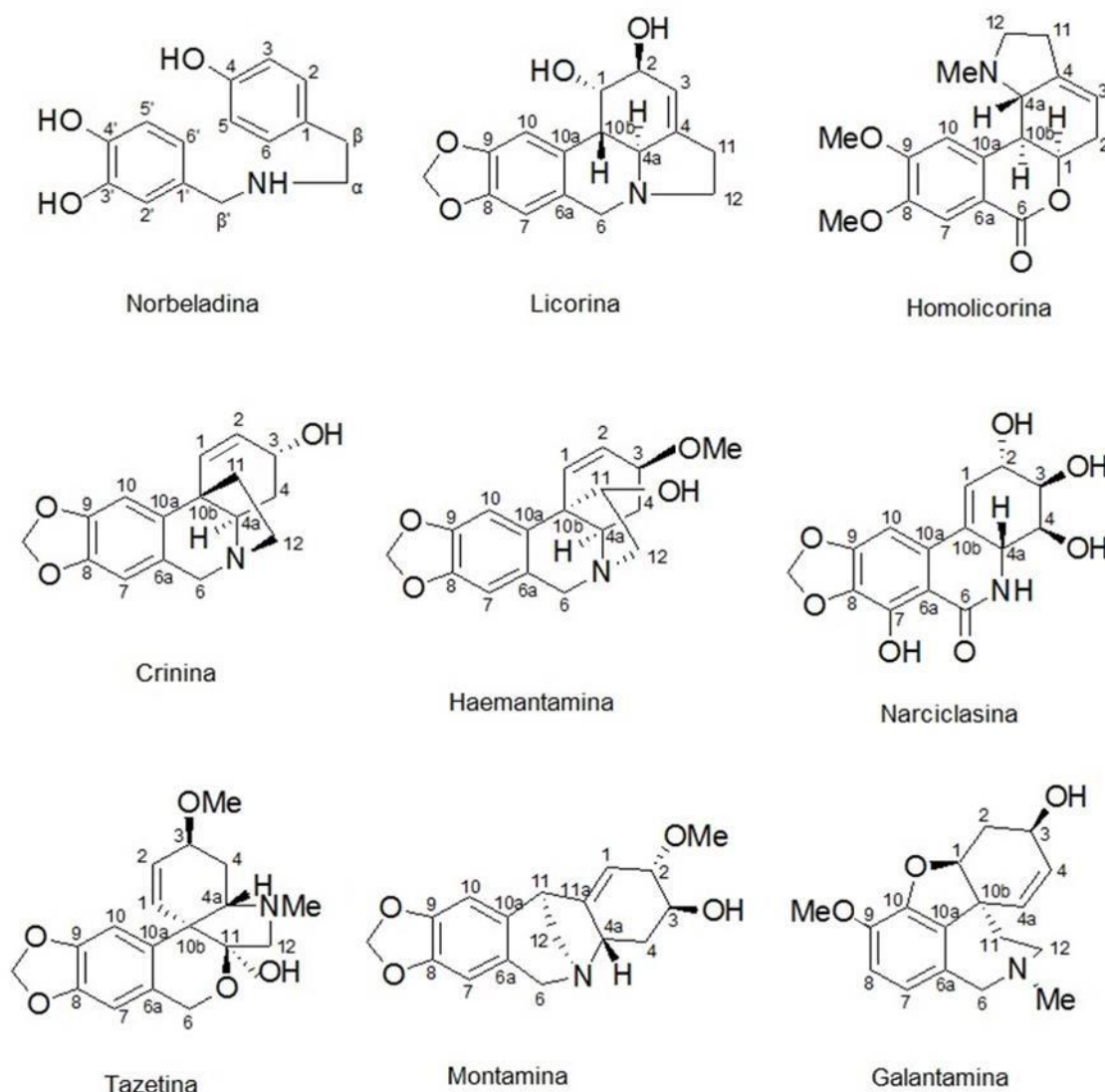
Os alcaloides de Amaryllidaceae são do tipo isoquinolínicos (ou seja, são derivados dos aminoácidos L-tirosina e L-fenilalanina), que dão origem ao intermediário chave desta família, a norbeladina (Figura 2) e têm sido isolados de todos os gêneros da subfamília sendo quase que exclusivas da mesma, uma vez que a maioria deles não é conhecida por ocorrer em plantas de outras famílias (BASTIDA et al 2006; BASTIDA, et al, 2011).



**Figura 2:** Representação da síntese de norbeladina. Fonte: BASTIDA, 2006.

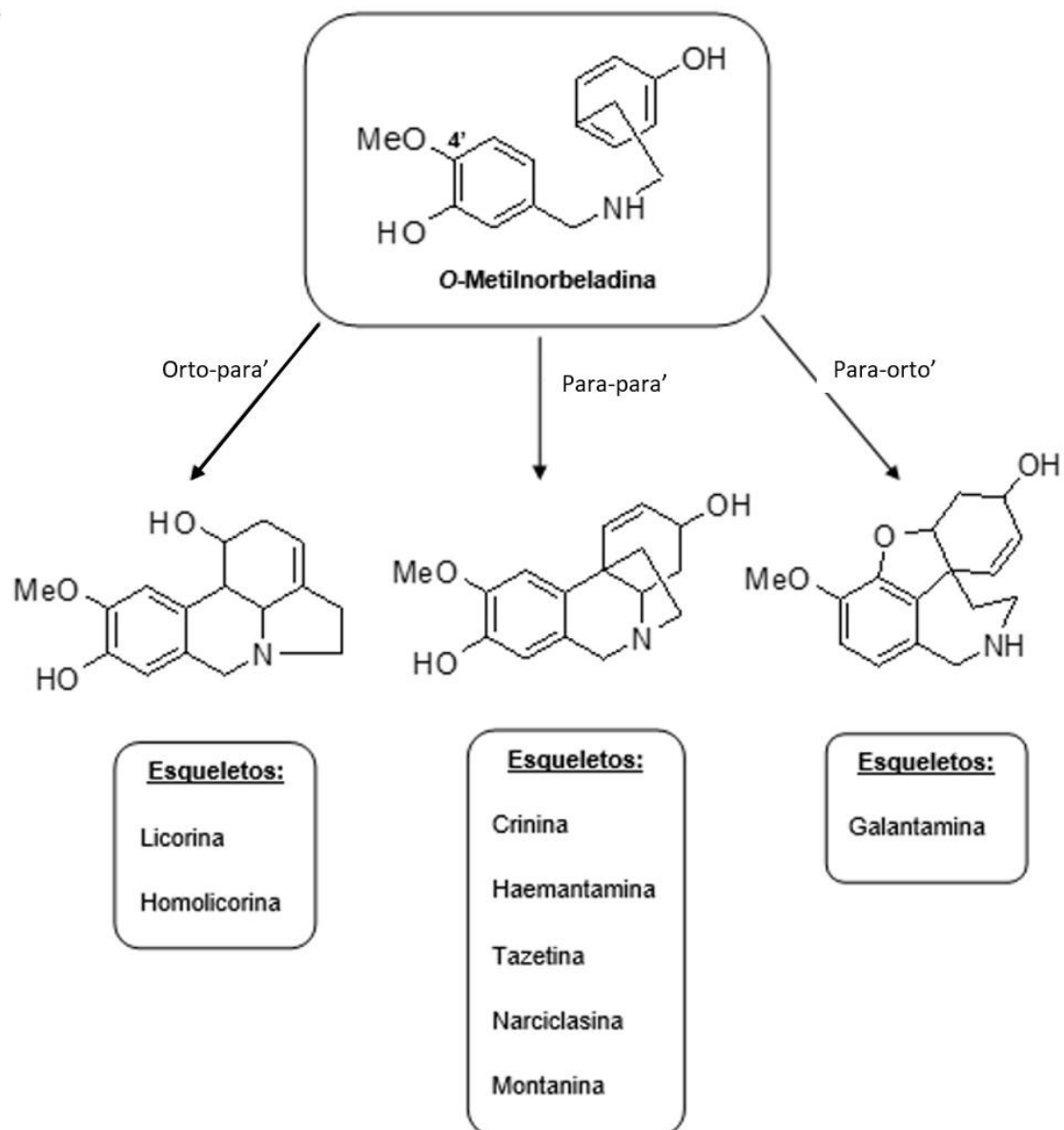
As estruturas dos alcaloides de Amaryllidaceae podem variar mesmo sendo biogeneticamente relacionadas. Embora ocorra esta variedade de estruturas, estes alcaloides são classificados em nove grupos de esqueleto tipo norbeladina, licorina, homolicorina, crinina, haemantamina, narciclasina,

tazetina, montanina e galantamina, sendo representados na Figura 3 (BASTIDA, 2006; GHOSAL et al 1985).



**Figura 3:** Representação dos tipos de esqueletos de alcaloides de Amaryllidaceae.

O acoplamento fenol oxidativo *orto-para* origina os esqueletos do tipo licorina e homolicorina, o *para-para* origina os esqueletos do tipo crinina, harmantamina, tazetina, narciclasina e montanina, enquanto o acoplamento *para-orto* origina o esqueleto do tipo galantamina (Figura 4) (BASTIDA *et al.*, 2006). A numeração dos tipos de esqueletos é baseada no modelo de Ghosal (GHOSAL, 1985).



**Figura 4:** Acoplamento fenol oxidativo em alcaloides de Amaryllidaceae

O primeiro alcaloide isolado de Amaryllidaceae foi a licorina, em 1877. Foi extraída a partir de *Lycoris radiata*, contudo, este tornou-se completamente caracterizado quase um século depois.

A galantamina é um dos alcaloides de maior importância de acordo com seu potencial biológico (Figura 3). A mesma foi isolada primeiramente em 1952,

a partir da extração em *Galanthus woronowii*, uma espécie nativa da Turquia. A galantamina possui ação inibitória da enzima acetilcolinesterase, sendo atualmente comercializada na forma de bromidrato de galantamina, com o nome de Razadyne<sup>®</sup> ou Reminyl, aprovada pela FDA desde 2001, tendo como finalidade o tratamento paliativo de pacientes com doença de Alzheimer. É uma molécula com segurança clínica confirmada e que possui capacidade de potencializar a transmissão colinérgica por modulação alostérica positiva de receptores nicotínicos pré-sinápticos (MAELICKE et al., 2001). Com a aprovação da galantamina no tratamento do mal de Alzheimer, os pesquisadores se interessaram mais ainda em realizar estudos com espécies de Amaryllidaceae que possuam alcaloides com o esqueleto galantamina, considerando que sua ação terapêutica é proveniente à sua estrutura. Por conseguinte, outros alcaloides já demonstraram possuir atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase, semelhante ou superior à galantamina (IC<sub>50</sub> 1,07 µM, *in vitro*), como a sanguinina (IC<sub>50</sub> 0,10 µM), e a 1-O-acetillicorina (IC<sub>50</sub> 0,96 µM) (HOUGHTON et al., 2006). O alcaloide sanguinina diferencia-se da estrutura do alcaloide galantamina pela substituição do grupo metoxila aromático por um grupo hidroxila aromático. Esta alteração torna este alcaloide ainda mais potente que a galantamina quanto à inibição da enzima acetilcolinesterase (HOUGHTON et al., 2006), tornando-se assim, um dos alcaloides de Amaryllidaceae mais promissores da atualidade.

Estudos revelam a presença de atividades terapêuticas em diversos outros alcaloides de Amaryllidaceae. A licorina, encontrada na grande maioria de espécies deste gênero, possui vasta atividade biológica. Possuindo ação antiviral (HIV-1), antifúngica (*Candida albicans*), antiprotzoária (*Trichomonas vaginalis*) e anti-inflamatória (GIORDANI et al., 2010; GIORDANI et al., 2011), além de ser inibidora do crescimento e da divisão celular e da síntese de ácido ascórbico (BASTIDA et al., 2006). Além disto, a licorina possui atividade inibitória contra a acetilcolinesterase e ação antioxidante (ELGORASHI et al., 2004; HOUGHTON et al., 2006; GIORDANI et al., 2008).

Alcaloides com esqueleto do tipo homolicorina são amplamente estudados, e os compostos desta classe apresentam diversas atividades biológicas como:

atividade citotóxica contra células fibroblásticas não-tumorais (WENIGER *et al.*, 1995, atividade neuroprotetora contra estresse oxidativos em neuroblastomas (LI, *et al.*, 2014), efeito indutor de hipersensibilidade tardia em animais (GUDE *et al.*, 1988). A homolicorina possui atividade citotóxica, assim como a hipeastrina, a primeira possui ação antifúngica contra *Candida albicans* e ação hipotensora em ratos normohipertensivos, porém, a segunda também possui atividade contra *Herpes simplex* do tipo 1. A maioria dos alcaloides que demonstram ação antiproliferativa promissora também possuem atividade de indução do apoptose (CEDRON *et al.*, 2010). Por exemplo, a candimina, isolada de *Hippeastrum morelianum*, apresentou grande atividade citotóxica para o parasita *Trichomonas vaginalis*, enquanto montanina isolada de *H. vittatum* apresentou atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase e atividades psicofarmacológicas, como antidepressiva, anticonvulsivante e ansiolítica (GIORDANI *et al.*, 2010; PAGLIOSA *et al.*, 2010; da SILVA *et al.*, 2006).

A narciclasina apresenta ação antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* (BASTIDA *et al.*, 2011) e bacteriostática contra *Neisseria gonorrhoeae* (PETTIT *et al.*, 2002). Além disso, possui ação profilática para o tratamento de artrite em ratos. Foi observado desinchaço significativo em articulações destes animais (MIKAMI, *et al.*, 1999).

Sendo assim, vale destacar que o estudo de plantas da família Amaryllidaceae é importante, tendo como objetivo, principalmente, a elucidação química completa de seus alcaloides e determinação de atividades biológicas para diversos alvos terapêuticos, visto que há um grande grupo de substâncias com potencial biológico para serem pesquisadas (COOK e LOUDON, 1952; BASTIDA *et al.*, 2011; ELGORAGHI *et al.*, 2004).

#### 1.4 HIPPEASTRUM

O gênero *Hippeastrum* merece destaque dentre os pertencentes à família Amaryllidaceae. Apresenta diversas espécies ornamentais no Brasil,

com ampla variação de cor das suas flores (DUTILH, 2005). O nome do gênero provém do grego *Hippos* = cavalo + *Aston* = estrela, uma vez que suas flores se apresentam como tal (AMARAL, 2006). Este gênero é endêmico da América do Sul e encontra-se amplamente distribuído no Brasil, apresentando 30 espécies, das quais 21 são endêmicas (de ANDRADE et al, 2011; DUTILH e OLIVEIRA, 2016). As espécies desse gênero estão presentes nos mais diferentes biomas brasileiros, como o cerrado, a caatinga, a Mata Atlântica e os campos de altitude (AMARAL, 2007; OLIVEIRA et al., 2013).

Apesar dos poucos estudos fitoquímicos e farmacológicos envolvendo as espécies do gênero *Hippeastrum*, quando comparados aos demais de ocorrência europeia (GIORDANI et al, 2008), alguns alcaloides já foram descritos em espécies do sul do Brasil. Tendo em vista a diversidade de atividades biológicas que os alcaloides presentes na família Amaryllidaceae apresentam, diversos estudos fitoquímicos vêm sendo realizados, principalmente com o gênero *Hippeastrum*, seja no âmbito de caracterização de novos alcaloides e/ou na avaliação de suas propriedades biológicas.

Os estudos fitoquímicos deste gênero iniciaram-se no ano de 1950, e até 1960 já haviam sido isolados alcaloides como: licorina, tazetina, montanina, galantamina, haemantamina, homolicorina, hipeastrina, entre outros. No entanto, como a maioria dos alcaloides de Amaryllidaceae, os compostos encontrados no gênero *Hippeastrum* ainda foram relativamente pouco avaliados quanto às atividades biológicas, se comparados aos de ocorrência europeia e asiática (GIORDANI et al., 2008), embora alguns compostos isolados de *Hippeastrum* encontrados no Brasil tenham apresentados propriedades interessantes e atividades biológicas importantes (de ANDRADE et al., 2012).

A montanina isolada de *Hippeastrum vittatum*, cuja apresentou atividade antidepressiva, anticonvulsivante, ansiolítica e capacidade de inibição da enzima acetilcolinesterase. A candimina foi isolada a partir de *Hippeastrum morelianum* e foi evidenciado que este alcaloide apresenta ação citotóxica frente ao parasita *Trichomonas vaginalis*. A licorina foi isolada de diferentes

espécies do gênero *Hippeastrum* e apresenta efeito antioxidante (GIORDANI et al., 2010; PAGLIOSA et al., 2010). A partir de *Hippeastrum solandriflorum* foram isolados os alcaloides pseudolicorina e narciclasina, os quais dispuseram de ação citotóxica para diferentes linhagens de células tumorais (CARVALHO et al., 2015). Em 2016 foi realizado um estudo com *Hippeastrum auliculum* por Bessa e colaboradores onde foi encontrado *N*-óxido haemantamina pela primeira vez em fonte natural, além de haemantamina, albomaculina, haemantidina, 6-epihaemantidina, *N*-óxido haemantamina, 7-metoxi-*O*-metillicorenina, aulicina, licorina, trisfaeridina e galantina.

### 1.5 A ESPÉCIE ESTUDADA: *Hippeastrum puniceum*

*Hippeastrum puniceum* (Lam.) Kuntze, é descrita por Amaral, 2007 por possuir **bulbos** subterrâneos, continuados em um colo curto ou longo. **Folhas** dísticas, laminares, margem lisa, reta, raramente pecioladas, ensiformes a falcadas, geralmente eretas e senescentes na estação seca, às vezes levemente revoluta, às vezes hialinas. **Umbelas** geralmente 1-4 flora; escapo liso, fistuloso, geralmente glauco, na base duas brácteas espatáceas livres. **Flores** vistosas, eretas a declinadas, zigomorfas, pediceladas, pedicelo às vezes glauco; tépalas livres ou conatas na base, esverdeadas a róseas, raramente brancas, às vezes com estrias ou retículos mais escuros, presença de corona ou paraperigônio; estames 6, declinados, de comprimentos diferentes; ovário ínfero, óvulos numerosos; estigma capitado, trilobado a trifido. **Cápsulas** loculicidas, depresso- globosas, 3-sulcadas, deiscência loculicida; sementes numerosas, papiráceas, aladas, oval-depressas a arredondadas, globosas, cinza-escuras a negras. A Figura 5 refere-se à *Hippeastrum puniceum* florida.





Figura 5: *Hippeastrum puniceum* (Lam.) Kuntze. (AMARAL, 2007).

A literatura relata três estudos com *Hippeastrum puniceum* sendo que em 1991 foi descrita a presença de vittatina, 11-hidroxivittatina e 3-O-acetilnarcissidina (QUIRION e HUSSON 1991). Em outro estudo, a análise de CG-EM revelou a presença de apenas dois alcaloides em *H. puniceum*, sendo estes a 11,12-dihidroanidrolícorina e lícorina. (CORTES, 2014). Além destes, foi identificada a presença de 3-O-acetilnarcissidina também nos bulbos de *Hippeastrum puniceum*. (SANTANA et al, 2008). A lícorina foi o primeiro alcaloide isolado da família Amaryllidaceae, como já dito anteriormente (no século XIX). Contudo, apenas em meados do século XX foram retomados os estudos químicos com plantas desta família. O interesse inicial foi baseado principalmente nas potenciais atividades antivirais e antitumorais dos mesmos. Desde então, os estudos em plantas da família Amaryllidaceae vem ganhando mais espaço no ambiente de pesquisas tanto fitoquímico quanto biológico (ANDRADE e ZUANAZZI, 2007).

A 9-O-desmetillicoramina, outro alcaloide encontrado em *Hippeastrum puniceum* apresenta escassos estudos a seu respeito. Foi identificado por Kihara e colaboradores em 1991 e apenas em 2015, foi citada novamente por Zhan e seus colaboradores. Neste último estudo foi identificado que a 9-O-desmetillicoramina possui ação inibitória significativa da enzima

acetilcolinesterase, porém esta ainda é menor do que a da galantamina (utilizada atualmente como fármaco para inibição desta enzima) (ZHAN, et al., 2015).

A 9-O-desmetil-2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina foi isolada e identificada pela primeira vez de *Narcissus tortifolius*, em 1990 por Bastida e colaboradores. Contudo, apesar de já haver mais de duas décadas após o seu isolamento, a mesma ainda se encontra carente de estudos no que se refere as ações biológicas (BASTIDA et al., 1990).

O alcaloide 3-O-acetilnarcissidina, como já mencionado anteriormente, foi encontrado em *H. puniceum* em 2008 por Santana e colaboradores. Este alcaloide apresenta ação inseticida contra *Spodoptera littoralis* e inibe o crescimento, desenvolvimento e germinação de algumas plantas, como *Amaranthus hypochondriacus*, *Rottboellia cochinchinensis* e *Panicum maximum*. Este alcaloide atua em *Hippeastrum puniceum* protegendo-o de alguns herbívoros e plantas (SANTANA et al., 2008).

A vittatina, possui atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Além disso, possui capacidade de potencializar o efeito analgésico da morfina. Essa, juntamente com a O-metilnorbeladina está relacionada com os intermediários da síntese de narciclasina, que por sua vez, vai dar origem à 11-hidroxivittatina (BASTIDA et al., 2011).

Desse modo, faz-se necessário a realização de estudos sob o ponto de vista químico-biológico que abordem a busca por moléculas bioativas de origem natural. A espécie *Hippeastrum puniceum* faz parte do universo de plantas que possuem poucos estudos científicos que estejam relacionados com sua caracterização química ou ainda que comprovem seus efeitos biológicos observados pelo uso popular.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Estudar a composição química dos bulbos da espécie *Hippeastrum puniceum* (Lam.) Kuntz. bem como avaliar possíveis atividades biológicas dessa espécie.

### 2.2 ESPECÍFICOS

Identificar as classes de metabólitos secundários presentes no extrato metanólico dos bulbos de *Hippeastrum puniceum* por meio de ensaios fitoquímicos preliminares;

- Isolar e identificar os alcaloides presentes em *Hippeastrum puniceum*;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato metanólico e das frações hexânica, acetato de etila e acetato de etila:metanol (3:1) de *Hippeastrum puniceum*.
- Analisar o potencial trombolítico *in vitro* do extrato metanólico e das frações de hexânica, acetato de etila e acetato de etila:metanol (3:1) de *Hippeastrum puniceum*.

### 3 MÉTODOS

#### 3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi coletado em Recife, PE na mata atlântica e foi devidamente identificado, com a posterior deposição no Herbário da Universidade Federal do Espírito Santo (VIES), da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), sob o número de identificação AA-1768 VIES 38994. A coleta e a identificação botânica espécie vegetal foram realizadas pelos professores Dr. Warley Borges e Dr. Anderson Alves Araújo, respectivamente.

#### 3.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO (HpEB)

Os bulbos de *Hippeastrum puniceum* (1,8Kg) foram secos em estufa de ar circulante a 40° C e posteriormente triturados. O material seco foi macerado com metanol, por 48 horas, e submetido a filtração. O resíduo foi submetido a mais outras duas macerações por 48h com metanol P.A. e filtrado novamente. Os três filtrados foram reunidos e rotaevaporados sob baixa pressão em banho maria à 38 °C originando o extrato metanólico que foi armazenado em geladeira (2 – 8 °C).

#### 3.3 TRIAGEM FITOQUÍMICA PRELIMINAR

Foi realizada a triagem fitoquímica preliminar do extrato bruto metanólico de *Hippeastrum puniceum* visando determinar a presença ou ausência das principais classes de metabólitos secundários. Dentre estes, alcaloides, cumarinas, saponinas, flavonoides, triterpenos, esteroides, antraquinonas e taninos. Para isso, foram realizadas reações de precipitação, alteração de cor e formação de fluorescência ou espuma, sendo específicas para cada metabólito (CUNHA 2010; FAINTANIN 2016).

### 3.3.1 Alcaloides

Para a determinação de alcaloides, foi adicionado 1 mL de ácido clorídrico concentrado e 7 gotas de reagente de Draggendorff uma alíquota de 800 µL de extrato bruto metanólico. A presença de precipitado laranja identifica a presença de alcaloides (FAINTANIN 2016).

### 3.3.2 Flavonoides

Na identificação de flavonoides foram realizadas duas reações. A primeira, reação de Shinoda, consiste na adição de 1 mL de ácido clorídrico concentrado em 800 µL de extrato diluído em etanol e posteriormente, são inseridos fragmentos de cloreto de magnésio. É indicativo da presença de flavonoides a alteração da cor da solução para vermelho. Outra reação realizada foi com cloreto de alumínio, que consiste em adicionar gotas de solução etanólica de cloreto de alumínio 2% p/v em 800 µL de solução etanólica do extrato bruto metanólico numa capsula de porcelana. Posteriormente, esta capsula é aquecida até que seque completamente. Em seguida, a capsula fora submetida a observação sob luz UV para verificação de fluorescência (FAINTANIN 2016).

### 3.3.3 Saponinas

A detecção de saponinas foi realizada adicionando-se gradualmente duas gotas de solução de carbonato de cálcio saturada em 1600 µL de extrato metanólico para obter a neutralidade da solução, verificando o pH com fita teste. Por seguinte, a mistura foi aquecida até ebulição e depois, o volume foi completado para 100 mL com água destilada. O tubo foi agitado vigorosamente por um minuto. A formação de mais de um centímetro de espuma persistente caracteriza a presença de saponinas (FAINTANIN 2016).

### **3.3.4 Triterpenos e Esteróides**

Para a determinação do comparecimento de triterpenos e esteroides foi realizada a reação de Liebermann-Burchard, para a qual deve ser adicionado 2 mL de anidrido acético a 800 µL de solução etanólica do extrato bruto metanólico em um tubo de ensaio. Posteriormente, o mesmo foi agitado suavemente e em seguida, foram adicionados quatro gotas de ácido sulfúrico. A alteração da cor da solução para verde indica a presença de esteroides, porém quando a coloração varia de castanho a vermelho, indica a presença de triterpenos (FAINTANIN 2016).

### **3.3.5 Taninos**

A identificação de taninos consiste em adicionar gotas de cloreto férrico (10%) em 800 µL de solução etanólica do extrato bruto metanólico. Com isso, os taninos pirogálicos desenvolvem coloração azul ou violeta e os taninos pirocatéquicos desenvolvem coloração verde (FAINTANIN 2016).

### **3.3.6 Cumarinas**

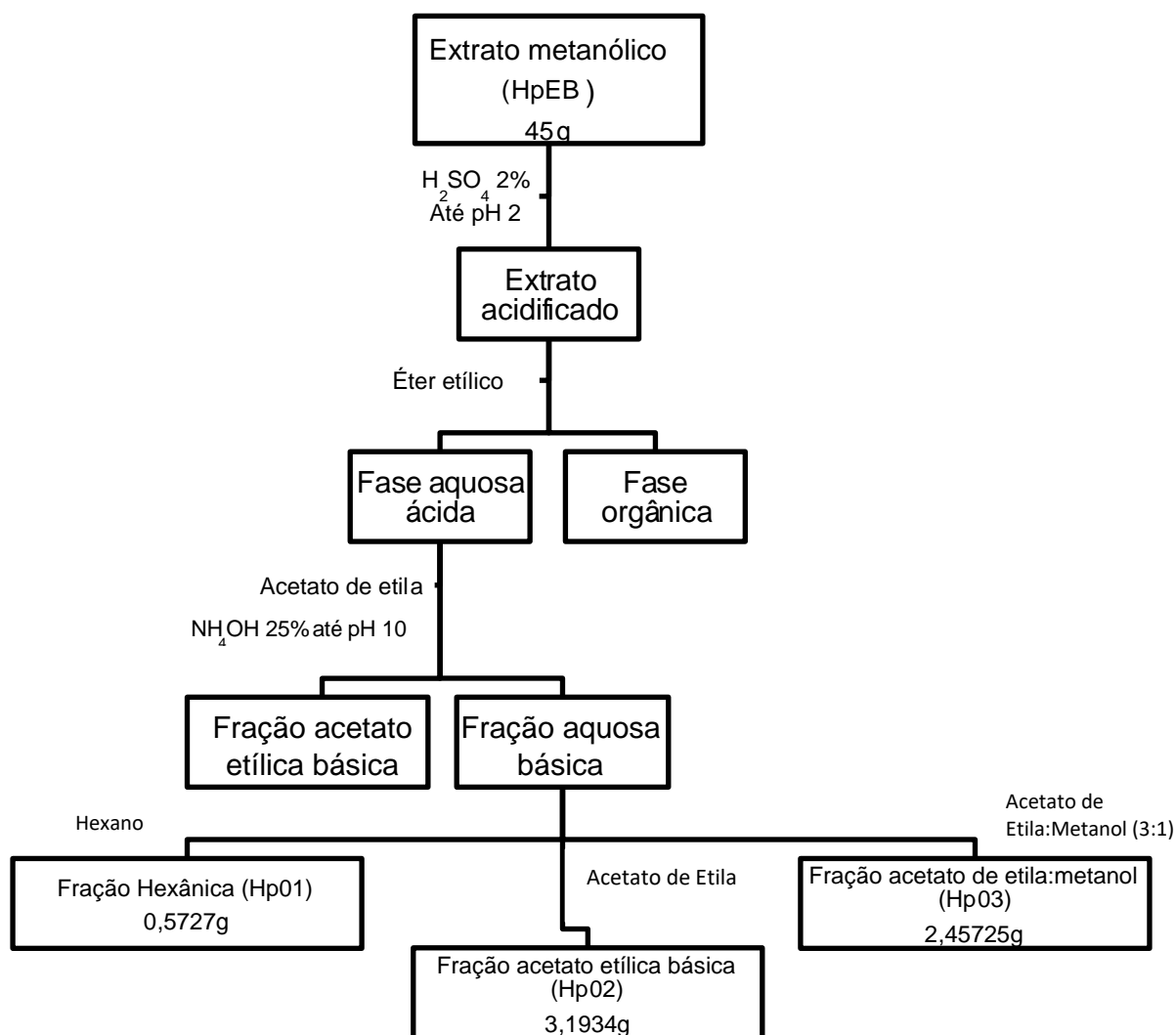
Para a identificação da presença de cumarinas foi aplicada uma gota de solução metanólica do extrato bruto metanólico em um papel de filtro. Este, por sua vez, foi observado sob luz UV para análise da presença ou ausência de fluorescência. Em seguida foi adicionada, uma gota de hidróxido de potássio (10%) sobre a amostra, a qual foi analisada novamente na câmara de UV para identificação de fluorescência. A fluorescência azul na mancha indica a presença de cumarina (FAINTANIN 2016).

### 3.3.7 Antraquinonas

A determinação de antraquinonas foi realizada adicionando-se 10 mL de ácido sulfúrico (10%) em 800 µL de solução etanólica de extrato bruto metanólico em um funil de decantação. Em seguida, foi realizada extração com éter etílico (3 vezes), sendo que as extrações não foram unidas. Foram adicionados 2 mL de hidróxido de potássio (10% v/v) em todas as alíquotas e agitadas vigorosamente. Após a separação das fases orgânica e aquosa, na presença de antraquinonas, a fase aquosa se torna de rosa a vermelha (FAINTANIN 2016).

### 3.4 EXTRAÇÃO ÁCIDO-BASE

Foram adicionados ao extrato bruto (45 g) gotas de solução aquosa de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) a 2% (v/v) até pH 2. Em seguida, a solução ácida foi lavada com éter etílico (7 x 150mL) e extraída com acetato de etila (5 x 150 mL). A fração etérea foi desprezada e a fração acetato de etila em pH ácido foi armazenada para posterior confirmação de presença de alcaloides. A fase aquosa remanescente foi alcalinizada com solução aquosa de hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) 32% até pH 10. A fase aquosa básica foi extraída com *n*-hexano (8 x 150 mL), seguido de acetato de etila (20 x 150 mL) e, finalmente, uma mistura de acetato de etila:metanol (3:1) (2 x 150 mL) (SIMÕES, 2007). As extrações cessaram a partir do momento que a fase aquosa apresenta resultado negativo para o reagente Dragendorff (reagente utilizado para a identificação de alcaloides). A Figura 6 ilustra o procedimento de extração ácido-base.



**Figura 6:** Processo de extração ácido-base do metanólico dos bulbos de *Hippeastrum puniceum*

### 3.5 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE *Hippeastrum puniceum*

A análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/MS) foi realizada no extrato metanólico (HpEB) e as frações hexânica (Hp01), acetato de etila (Hp02) e acetato de etila:metanol (3:1) (Hp03) dos bulbos de *Hippeastrum puniceum* para identificação prévia dos alcaloides presentes em cada fração. As amostras foram solubilizadas em metanol P.A. apresentando concentração de 1 mg/mL para esta análise.



Foi utilizado cromatógrafo CG-17A Shimadzu, modelo CG-EM QP 5000, operando no modo EI a 70 eV usando coluna apolar DB-1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) Com temperatura entre 100 e 180 °C a 15 °C min<sup>-1</sup>, 1 min em 180 °C, 180–300 °C a 5 °C min<sup>-1</sup> e 40 min a 300 °C. Temperatura no injetor: 280°C. Fluxo de gás: 0,8 mL/min com gás hélio. Temperatura de interface do detector: 250°C. Os resultados foram comparados com a biblioteca particular de alcaloides do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Jaume Bastida em Barcelona, a qual é atualizada frequentemente.

### **3.5.1 Fracionamento de Hp01**

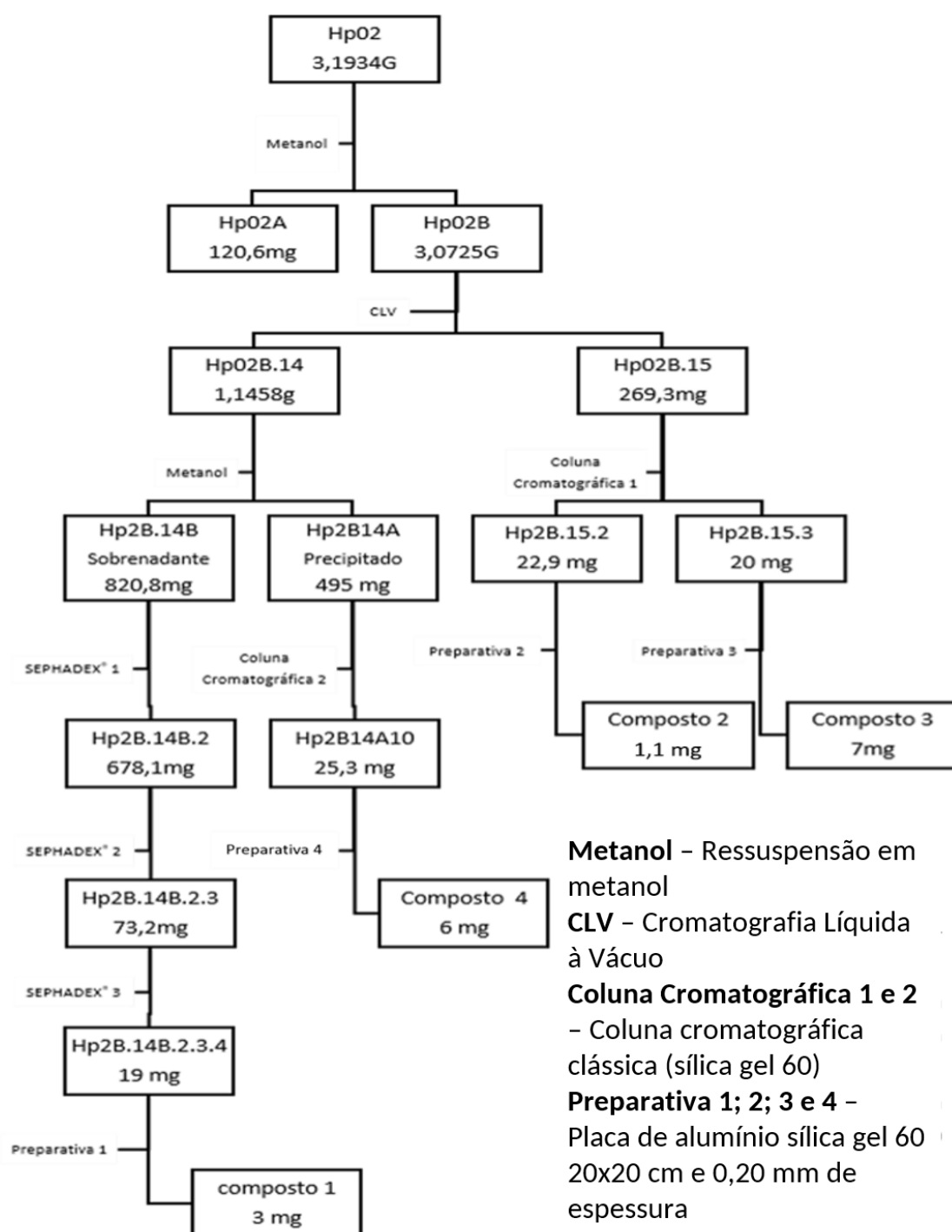
Hp01 (0,5727 g) apresenta-se sob a forma líquida, com odor de graxa, coloração amarela. Esta foi submetida à sucessivas lavagens com metanol P.A. gerando duas frações, Hp01A (precipitado– 5,37 mg) e Hp01B (sobrenadante– 0,35337g).

### **3.5.2 Fracionamento de Hp02**

A fração de acetato de etila (3,1934g) foi submetida a lavagem com metanol, o que ocasionou a formação de um precipitado branco. Este foi separado do sobrenadante cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta Pasteur dando origem à fração Hp02A (120,6 mg). O sobrenadante foi denominado Hp02B (3,0725 g). A figura 7 representa os procedimentos realizados a partir da fração Hp02.

A amostra Hp02B (3,0725 g) foi submetida à CLV (Cromatografia Líquida a Vácuo) utilizando uma coluna de vidro sinterizado e sílica 60 (70 – 90 µm) com altura de 50 cm e diâmetro de 3 cm. Cada alíquota coletada possuía aproximadamente 50 mL e a cada quatro alíquotas, o sistema de solventes utilizado era alterado. Os sistemas de solventes utilizados para este procedimento estão descritos na Tabela 1.

Após a realização da CLV, foi realizada a reunião das frações em 19 grupos de acordo com a comparação das análises feitas em CCD, observadas sob radiação ultravioleta sob luz de comprimento de onda de 254 e 365 nm e conseguinte revelação com o reagente de Dragendorff.



**Figura 7:** Fracionamento de Hp02.

Tabela 1: Representação dos eluentes utilizados na CLV.

Alíquota	Sistema Solvente		
	Hexano	Acetato de etila	
1-4	200 mL	0	
5-8	180 mL	20 mL	
9-12	160 mL	40 mL	
13-16	140 mL	60 mL	
17-20	130 mL	70 mL	
21-24	120 mL	80 mL	
25-28	110 mL	90 mL	
29-32	100 mL	100 mL	
	Hexano	Acetato de etila	Clorofórmio
33-36	98 mL	100 mL	2 mL
37-40	96 mL	100 mL	4 mL
41-44	92 mL	100 mL	8 mL
45-48	88 mL	100 mL	12 mL
49-52	80 mL	100 mL	20 mL
53-56	74 mL	100 mL	26 mL
57-60	64 mL	100 mL	36 mL
61-64	58 mL	100 mL	42 mL
65-68	52 mL	100 mL	48 mL
69-72	40 mL	100 mL	60 mL
73-76	32 mL	100 mL	68 mL
77-80	20 mL	100 mL	80 mL
81-84	10 mL	100 mL	90 mL
85-88	0 mL	100mL	100mL

Continuação Tabela 1

	Acetato de etila:diclorometano (1:1)	Metanol
89-92	198	2 mL
93-96	196 mL	4 mL
97-100	194 mL	6 mL
101-104	192 mL	8 mL
105-108	190 mL	10 mL
109-112	188 mL	12 mL
113-116	186 mL	14 mL
117-120	184 mL	16 mL
121-124	182 mL	18 mL
125-128	180 mL	20 mL
129-132	170 mL	30 mL
133-136	160 mL	40 mL
137-140	140 mL	60 mL
141-148	200 mL	200 mL
149-180	0	500 mL

A amostra Hp2B.14.B foi submetida a SEPHADEX<sup>®</sup> LH 20 1, utilizando metanol como eluente. Foram coletada 458 alíquotas com aproximadamente 1 mL cada. Estas foram analisadas por meio de CCD utilizando placas de sílica gel 60 ALUGRAM<sup>®</sup> SIL G/UV (MACHEREY-NAGEL), observadas sob radiação ultravioleta a 254 e 365 nm e reveladas com o reagente de Draggendorff. A fração Hp2B.14.B.2 foi submetida a SEPHADEX<sup>®</sup> LH20 2 utilizando metanol como solvente, sendo coletadas 94 alíquotas de aproximadamente 10 mL. Estas foram analisadas através de CCD utilizando placas de sílica gel 60 ALUGRAM<sup>®</sup> SIL G/UV (MACHEREY-NAGEL), observadas sob radiação ultravioleta a 254 e 365 nm e reveladas com com o reagente de Draggendorff. As alíquotas foram reunidas em cinco frações.

A fração Hp2B.14B.2.2.3 (72,4 mg) foi submetida a coluna de SEPHADEX<sup>®</sup> LH20 (31,2x1,6 cm), utilizando metanol como eluente. Foram coletados 20 tubos de ensaio com 5 mL cada, sendo que o primeiro e o último continham 50 mL.. Duas das frações obtidas, a Hp2B.14B.2.3.4 (19 mg) e a Hp2B.14B.2.3.2 (18,2 mg) quando reveladas com reagente de Dragendorff foram positivas para alcaloides. Sendo assim, foi realizada uma cromatografia preparativa com a Hp2B.14B.2.3.4 (denominada preparativa 1). Foi utilizada uma placa de CCD analítica (10x8 cm) com fins preparativos a fim de isolar os componentes presentes nesta fração. O sistema de solventes utilizado foi diclorometano, acetato de etila, metanol e hexano na proporção de 3:1:1:4 com atmosfera de NH<sub>3</sub>. Uma das quatro substâncias coletadas neste procedimento, é o composto 1 (4 mg de um sólido de cor branca) que se apresentou positivo para alcaloides quando revelado com reagente de Dragendorff.

A fração Hp02B.15 (269,3mg) foi submetida à cromatografia líquida em coluna de sílica gel 60 (2,6 x 51,7 cm) – coluna cromatográfica 1, foi realizada com de utilizando um sistema de solvente como descrito na Tabela 2. Cada fração continha aproximadamente 10 mL, com exceção das primeiras, sendo que as duas primeiras possuíam 50mL.

As alíquotas foram reunidas de acordo com suas similaridades em CCD sob luz U.V. e conseguinte revelação com reagente de Dragendorff. Dentre as frações reunidas, Hp2B.15.2 (22,9 mg) e Hp2B.15.3 (20 mg) apresentaram resultado positivo frente ao reagente de Dragendorff. Uma CCD analítica com finalidade preparativa foi realizada para cada uma destas frações.

**Tabela 2:** representação dos eluentes utilizados na coluna cromatográfica 1.

Fração	Eluentes
1-8	Acetato de etila
9-17	Acetato de etila:Metanol:Diclorometano (95:2,5:2,5)
18-27	Acetato de etila:Metanol:Diclorometano (90:5:5)
28-37	Acetato de etila:Metanol:Diclorometano (80:10:10)
38-45	Acetato de etila:Metanol:Diclorometano (70:15:15)
46-64	Acetato de etila:Metanol:Diclorometano (60:20:20)
65-74	Acetato de etila:Metanol:Diclorometano (50:25:25)
75-85	Acetato de etila:Metanol:Diclorometano (40:30:30)
86-107	Acetato de etila:Metanol:Diclorometano (30:35:35)
108-151	Acetato de etila:Metanol:Diclorometano (20:40:40)
152-172	Acetato de etila:Metanol:Diclorometano (10:45:45)
173-187	Diclorometano:Metanol (50:50)
188-212	Diclorometano:Metanol (40:60)
213-226	Diclorometano:Metanol (30:70)
227-233	Diclorometano:Metanol (20:80)
234-240	Diclorometano:Metanol (10:90)
241-253	Metanol

A fração Hp2B.15.2 (22,9 mg) foi submetida à preparativa 2, a qual foi realizada com uma placa de alumínio sílica gel 60 20x20 cm e 0,20 mm de espessura. Os eluentes utilizados foram diclorometano, acetato de etila, metanol, acetona e hexano na proporção de 1,1:5:1,1:1:1,1 respectivamente com atmosfera de NH<sub>3</sub>. Das sete frações coletadas, uma delas, o Composto 2 (1,1 mg de um sólido esbranquiçado), apresentou reação positiva para presença de alcaloides quando revelada com reagente de Dragendorff.

A fração a Hp2B.14B.2.3.2 foi submetida a CCD preparativa 3., utilizando placa de alumínio sílica gel 60 20x20 cm e 0,20 mm de espessura com o sistema de solventes: diclorometano:acetato de etila: acetona:hexano (2:1:3:10) com atmosfera de  $\text{NH}_3$ . Foram obtidas cinco frações. Destas, apenas o composto 3 (7 mg de um sólido branco muito solúvel em clorofórmio) apresentou-se positiva perante o reagente de Dragendorff.

Outra CCD analítica com finalidade preparativa foi realizada para a amostra Hp2B.15.3 (20 mg). O sistema solvente utilizado foi diclorometano, acetato de etila, metanol, acetona e hexano (5:3:2:2:6) com ambiente de  $\text{NH}_3$ . O composto 3, extraído a partir deste procedimento, foi positivo para presença de alcaloides quando revelada com reagente de Dragendorff.

A fração Hp2B14A (495 mg), o precipitado em metanol da fração Hp2B14, foi submetido à uma coluna líquida em coluna de sílica gel 60 (2,6 x 51,7 cm) - coluna cromatográfica. Foram coletadas 378 frações, cada continha 10 mL, com exceção das duas primeiras e da última. As duas primeiras totalizaram volume de 50 mL cada, já a fração 378 apresentou volume de 500 mL. O sistema de solvente utilizado encontra-se descrito na Tabela 3.

A fração Hp2B14A10 (25,3 mg) foi submetida à CCD preparativa 4 cuja é placa de alumínio sílica gel 60 20x20 cm e 0,20 mm mm de espessura .Utilizou-se diclorometano:acetato de etila:metanol:acetona:hexano (2:3:2:1:2) com atmosfera de  $\text{NH}_3$ . Foram obtidas 6 frações, destas, apenas o composto 4 (6 mg de um sólido solúvel em clorofórmio) apresentou positivo frente ao reagente de Dragendorff.

**Tabela 3:** Sistema de solventes utilizado na coluna cromatográfica 2.

Fração	Eluentes
--------	----------

---

1-2	Hexano
3 – 52	Hexano:Acetato de Etila (1:1)
53 – 106	Acetato de Etila
107 – 123	Acetato de Etila:Metanol (97,5:2,5)
53 – 106	Acetato de Etila
107 – 123	Acetato de Etila:Metanol (97,5:2,5)
124 – 143	Acetato de Etila:Metanol (95:5)
144 – 160	Acetato de Etila:Metanol (92,5:7,5)
161 – 171	Acetato de Etila:Metanol (90:10)
172 – 192	Acetato de Etila:Metanol (85:15)
193 – 209	Acetato de Etila:Metanol (80:20)
210 – 230	Acetato de Etila:Metanol (75:25)
231- 259	Acetato de Etila:Metanol (70:30)
260 – 291	Acetato de Etila:Metanol (60:40)
292 – 300	Acetato de Etila:Metanol (50:50)
301 – 312	Acetato de Etila:Metanol (40:60)
313 – 348	Acetato de Etila:Metanol (30:70)
349 – 367	Acetato de Etila:Metanol (20:80)
368- 377	Acetato de Etila:Metanol (10:90)
378	Metanol

---

Das demais frações não foram isoladas substâncias em quantidades suficientes e/ou pureza acessível a qualquer determinação.

As substâncias isoladas (Composto 1 ao 4) foram submetidas à análise espectrométrica por meio de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) para



determinação estrutural. Os espectros de RMN  $^1\text{H}$ , foram obtidos em espectrômetro Varian 400 MHz, sonda 5 mm Broadband.

### 3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TROMBOLÍTICA

A atividade trombolítica dos extratos foram avaliadas de acordo com o método proposto por Prasad et al (2006), modificado (FAINTANIN, 2016). Foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de sangue venoso humano em microtubos, os quais foram incubados a 37°C por 45 minutos para a formação de coágulos. O soro fora retirado e os coágulos pesados para se definir a massa individual dos coágulos formados. Posteriormente foi adicionado 150  $\mu\text{L}$  de cada amostra à 1 mg/mL. Foi realizada a adição de mesmo volume de controle positivo (o fármaco estreptoquinase) em microtubos com coágulos, na concentração de 100000 UI (solubilizada em água destilada). Após incubação a 37 °C por 90 minutos, o líquido resultante da lise dos coágulos foi retirado e os coágulos foram pesados novamente para observar a diferença na massa após a lise dos coágulos. Também foi avaliada a viabilidade do coágulo ao adicionar apenas o veículo do fármaco (água destilada) com o mesmo procedimento experimental (branco). Os resultados da atividade trombolítica foram expressos em porcentagem (%) de lise do coágulo. Todas as análises foram realizadas em quadruplicatas e em dias distintos. As amostras foram preparadas utilizando uma solução de água:propilenoglicol (9:1) de forma que a concentração final das amostras foi de 1 mg/mL.

A significância da porcentagem de lise dos coágulos estimulada pelos coágulos foi analisada por análise de variância (ANOVA) de uma via com o auxílio do programa IBM SPSS Statistics 22.0. O teste de Tukey foi utilizado como *post hoc* com o objetivo de identificar em qual concentração houve com diferença significativa. Os gráficos foram realizados com o programa Excel 2013. Esse ensaio foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFES sob número de parecer 148.873 (Anexo).

### 3.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Dois métodos espectrofotométricos foram utilizados para a avaliação *in vitro* da atividade antioxidante das amostras, sendo utilizados os radicais livres sintéticos 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6sulfônico) (ABTS).

O cálculo da capacidade de captura dos radicais livres foi realizado de acordo com a seguinte equação e expressa em porcentagem:

---

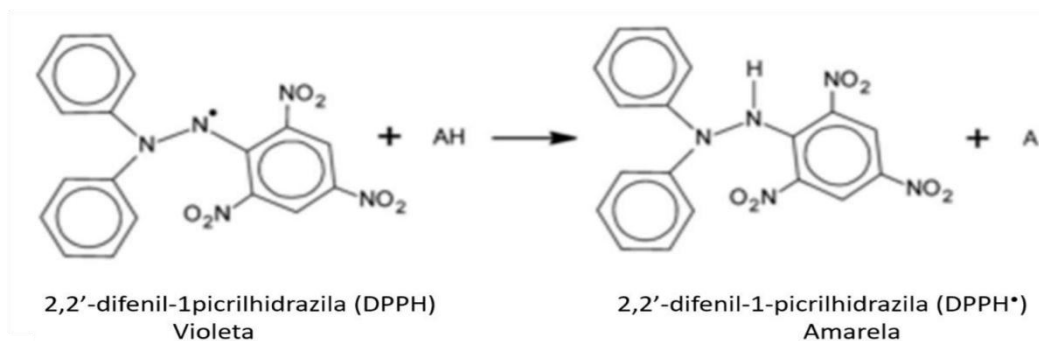

$$(\% \Delta) = (A_0 - A_1 / A_0) \times 100$$


---

- %  $\Delta$  □ porcentagem de inibição da amostra
- $A_0$  → absorvância da solução teste sem amostra (controle)
- $A_1$  → absorvância verificada com a adição da amostra depois de ocorrida a reação.

#### 3.7.1 Atividade inibitória do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH<sup>•</sup>)

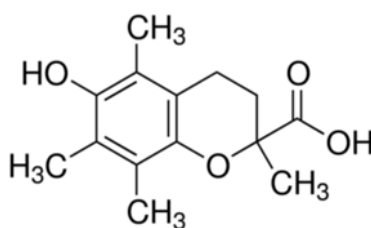
O radical antioxidante DPPH possui tonalidade violeta, com absorção em 517 nm quando na forma oxidada. Entretanto, o mesmo se apresenta, na forma reduzida, sua coloração é amarela. Quando acontece a redução do radical DPPH, a solução passa de violeta para amarela, reduzindo assim a absorção no comprimento de onda de 517 nm (Figura 8). Sendo assim, a absorção pode ser determinada por espectrofotometria. (MISHRA et al, 2012). O ensaio da atividade inibitória do radical DPPH<sup>•</sup> consiste em inserir 100 µL de amostra em diversas concentrações foram adicionados em 200 µL de solução de DPPH<sup>•</sup> a 0,004% (p/v) em etanol. Após 10 minutos à temperatura ambiente e posteriormente foi realizada a leitura espectrofotométrica. Esta, por sua vez, foi feita à 540 nm. Foi utilizado como controle (referência de máxima absorção) uma solução de 200 µL de radical DPPH<sup>•</sup> com 100 µL de etanol.



**Figura 8:** Ilustração esquemática da redução do radical DPPH (PYRZYNSKA E PEKAL, 2013).

Este teste foi realizado com as frações HpEb, Hp01, Hp02 e Hp03. 10 mg de cada extrato foram solubilizados separadamente em 1000 µL de etanol, a qual foi submetida à diluições seriadas a fim de obter as concentrações finais de 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL. O ensaio foi realizado três vezes, sendo todos em triplicata e em dias distintos.

Foi utilizado o ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (TROLOX) para controle positivo sendo obtidas as mesmas concentrações finais aos dos extratos. O TROLOX (Figura 9) é um derivado de vitamina E e possui grande capacidade antioxidante, sendo assim, é amplamente utilizado como padrão em testes de análises antioxidantes (United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 16 May 2012. Retrieved 13 June 2012).

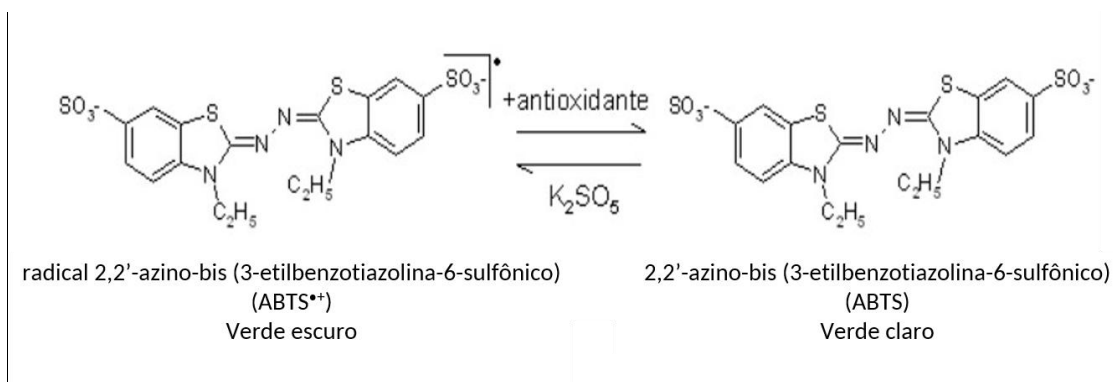


**Figura 9:** Estrutura química do TROLOX

### 3.7.2 Atividade inibitória do radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS<sup>•+</sup>)

A atividade inibitória do radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS<sup>•+</sup>) foi determinada segundo o método de Re et al. (1999) com adaptações. O ensaio fundamenta-se na reação do ABTS com persulfato de potássio gerando assim o radical ABTS<sup>•+</sup>. Este radical possui coloração azul esverdeado, cuja absorção é em 734 nm. A redução do ABTS<sup>•+</sup> por compostos antioxidantes acarreta na alteração da cor da solução para incolor, dessa forma, provoca a redução da intensidade de absorção à 734 nm (Figura 10). Com isso, foi realizada determinação da absorbância por espectrofotometria.

O procedimento consiste em incubar por 16 horas, ao abrigo de luz e calor, uma solução de ABTS (7 mM) e persulfato de potássio (2,45 mM). Forma-se a solução de ABTS<sup>•+</sup> que foi diluída em etanol P.A. para que possua absorbância de 0,7000 no comprimento de onda de 734 nm. Em microplacas de 24 poços foram adicionados 1 mL de solução de ABTS<sup>•+</sup> e 10 µL de diferentes concentrações das amostras e após cinco minutos 300 µL de cada solução são transferidos para uma microplaca de 96 poços viabilizando a leitura à 750 nm em um leitor de microplacas (iMark, BIO-RAD). Como controle foi utilizado 1 mL de solução de ABTS<sup>•+</sup> e 10 µL de etanol para referência máxima de absorção. O branco foi representado por 300 µL de etanol.



**Figura 10:** Estabilização do radical ABTS<sup>•+</sup> por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.

Este teste foi realizado com as frações HpEb, Hp01, Hp02 e Hp03. 10 mg de cada extrato foram solubilizados separadamente em 1000 µL de etanol, a qual foi submetida à diluições seriadas a fim de obter as concentrações finais de 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 6,25 µg/mL. O ensaio foi realizado três vezes, sendo todos em triplicata e em dias distintos. Foi utilizado o TROLOX para controle positivo sendo obtidas as mesmas concentrações finais aos dos extratos.

A análise estatística foi executada com o programa IBM SPSS Statistics 22.0 sendo utilizada a análise de variância (ANOVA) de uma via, considerando diferença estatisticamente significativa quando  $p \leq 0,05$  na comparação dos extratos com o padrão antioxidante. O teste de Tukey foi utilizado como *post hoc* com o propósito de obter-se as concentrações com diferença significativa estatisticamente. Os gráficos foram realizados no Excel 2013.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 PERFIL QUÍMICO

#### 4.1.1 Rendimento do extrato bruto

Foram obtidos 45 g de extrato bruto dos bulbos de *Hippeastrum puniceum*, demonstrando um rendimento de 2,5%. As frações hexânica (Hp01), acetato de etila (Hp02) e acetato de etila:metanol (3:1) (Hp03) apresentaram rendimento de 1,27%, 7,09% e 5,46% respectivamente.

#### 4.1.2 Triagem fitoquímica preliminar do extrato metanólico

O extrato metanólico dos bulbos de *Hippeastrum puniceum* foi submetido a análise fitoquímica preliminar, que indicou a presença de diversas classes químicas (Tabela 4).

*Hippeastrum puniceum* é uma espécie muito utilizada para fins de ornamentação e paisagismo por possuir flores vistosas, de coloração vermelho alaranjadas. São poucos estudos referentes a avaliação fitoquímica ou a ensaios de atividade biológica desta espécie relatados na literatura (AMARAL, 2007). A triagem fitoquímica preliminar viabiliza informações sobre os tipos de componentes químicos presentes nas plantas. Isso é um dado relevante quando não se dispõe dos mesmos na literatura. Nesta triagem foi identificada a presença de diversas classes químicas, contudo, vale ressaltar a presença de alcaloides, cujo um dos objetivos deste trabalho foi caracterizá-los.

**Tabela 4:** Classes químicas detectadas no extrato bruto de *Hippeastrum puniceum*.

Metabólitos secundários	Resultados
Flavonóides	+
Cumarinas	+
Alcaloides	+
Saponinas	-
Taninos	+
Esteroides	-
Triterpenos	+
Antraquinonas	-

(+) presença da classe química; (-) ausência da classe química.

#### 4.2 ANÁLISE DO EXTRATO POR CROMATOGRAFIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM)

As análises por CG-EM identificaram a presença de 11 alcaloides, sendo estes a 9-O-desmetillicoramina, licoramina, galantamina, assoanina, kirkina, 8-desmetilmaritidina, pancratina C, 11-hidroxitatantina, pseudolicorina, 2- $\alpha$ -hidroxihomolicorina e licorina. Os padrões de fragmentação encontram-se na tabela 5 e suas estruturas químicas, na Figura 11.

Todos os onze alcaloides foram encontrados na fração Hp02. Em Hp01 foi identificada apenas a presença de licoramina e no extrato metanólico (HpEb) foram identificados os alcaloides licoramina e licorina. Entretanto, em outras frações não foram identificados alcaloides. A identificação de apenas estes dois é justificada pelo fato deste extrato possuir muitas impurezas e baixa concentração dos outros alcaloides. Com a realização da extração seletiva para alcaloides estes interferentes são reduzidos e a concentração dos alcaloides presentes no extrato é aumentada em cada fração. Dessa forma, a

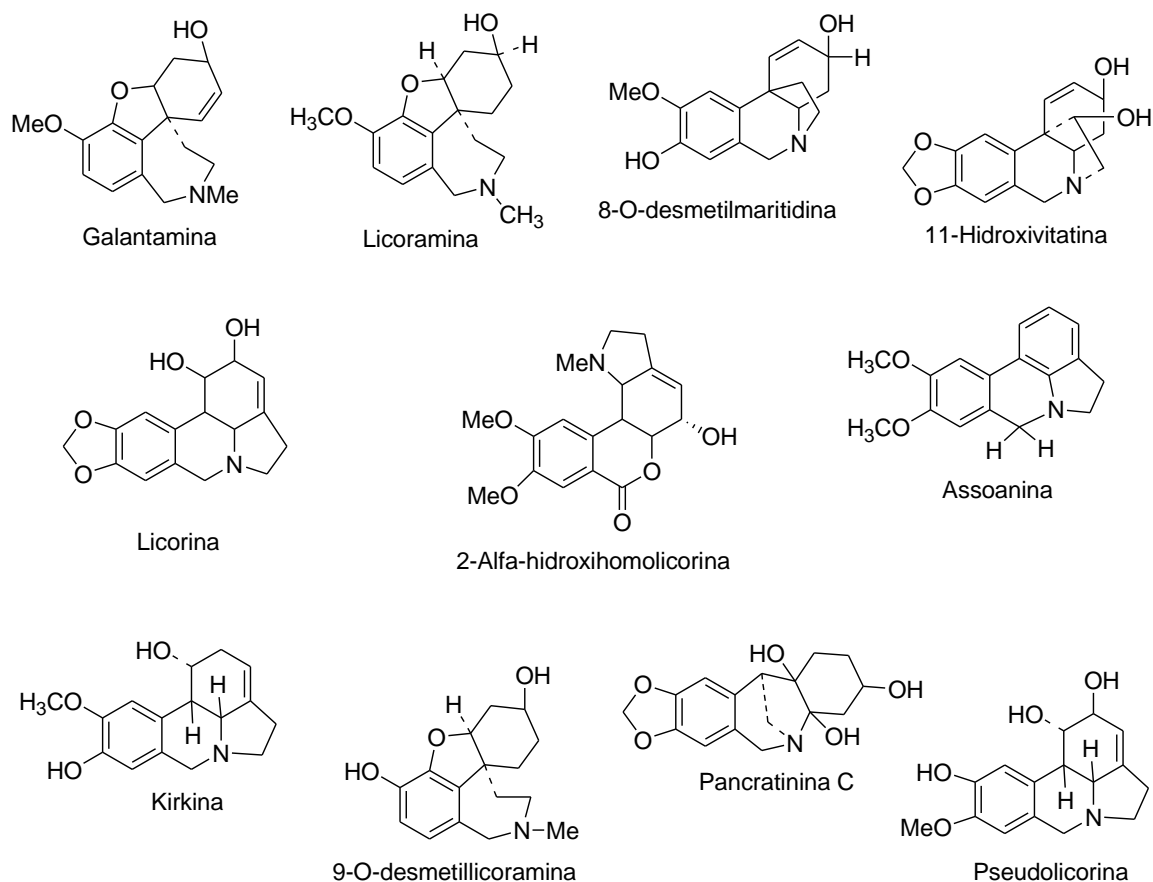
fração acetato etílica (Hp02) revela a presença de mais alcaloides do que no extrato bruto (HpEb).

**Tabela 5:** Dados de CG-EM de *Hippeastrum puniceum*.

Alcalóide	M <sup>+</sup>	EM
Galantamina	287(83)	286(100), 270(13), 244(24), 230(12), 216(33), 174(27), 115(12)
Licoramina	289(62)	288(100), 232(8), 202(14), 187(14), 159(9), 115(19)
8-O-Demetilmaritidina	273(100)	256(22), 230(20), 201(83), 189(42), 174(22), 128(23), 115(24)
11-Hidroxivittatina	287(5)	258(100), 211(15), 186(20), 181(23), 153(13), 128(24), 115(23)
Licorina	287(31)	286(19), 268(24), 250(15), 227(79), 226(100), 211(7), 147(15)
2α-hidroxihomolicorina	287(18)	272(13), 227(22), 211(13), 181(22), 149(30), 125(24), 111(34), 97(56), 139(100), 124(65)
Assoanina	267(49)	266(100), 250(22), 222(12), 193(9), 178(5), 154(5), 126(5), 96(6).
Kirkina	273(-)	252(100), 237(14), 238(4), 253(52), 254(9), 210(6), 96(4)
9-O-desmetillicoramina	274(100)	173(18), 145(14), 131(15), 128(13), 115(24), 91(14), 77(15),
Pancratinina C	287(47)	202(15), 188(54), 176(100), 175(69), 174(98), 161(46), 148(70), 77(25)
Pseudolicorina	289(23)	270(21), 252(12), 228(100), 214(10), 147(17), 111(18), 82(10)

(-) Ausência de abundância.





**Figura 11:** Estrutura dos alcaloides encontrados em *Hippeastrum puniceum*.

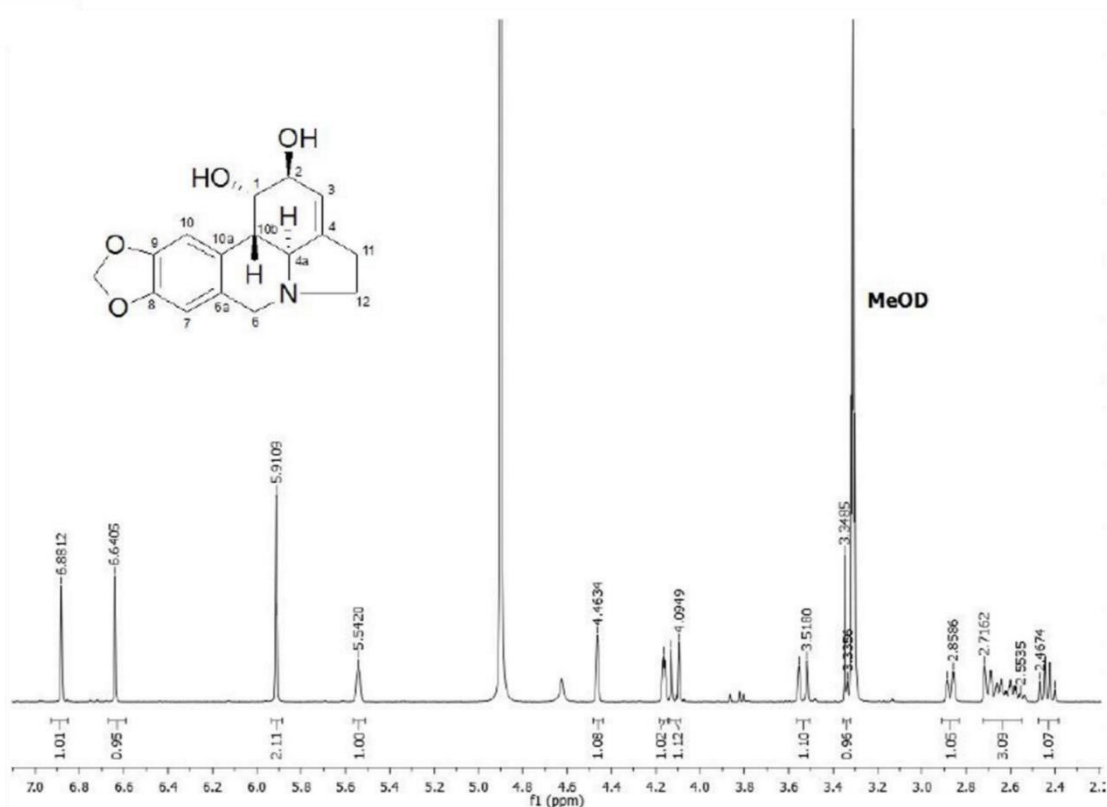
#### 4.3 IDENTIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS COMPONENTES QUÍMICOS ISOLADOS DE *HIPPEASTRUM PUNICEUM*

Na fração Hp02, foram isolados e identificados por meio de RMN  $^1\text{H}$  quatro compostos pertencentes à classe dos alcaloides isoquinolínicos. São eles: 9-O-desmetil-2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina, 9-O-desmetillicoramina, licorina e tazetina.

#### 4.3.1 Composto 1

Foi observado no espectro de RMN  $^1\text{H}$  dois simpletos referentes a hidrogênios aromáticos para orientados em  $\delta$  6,66 ppm e  $\delta$  6,89 ppm atribuídos aos H7 e H10, respectivamente; um sinal em  $\delta$  5,92 ppm integrando para 2H, típico do grupo metilenodioxifenila, dois dupletos em  $\delta$  2,32 ppm e  $\delta$  4,11 ppm ( $J = 14,0$  Hz), correspondentes aos hidrogênios da posição C-6 e ausência de sinais de metoxilas. As características desse espectro (Figura 12 e Tabela 6) indicam que esse composto é um alcaloide de esqueleto do tipo licorina.

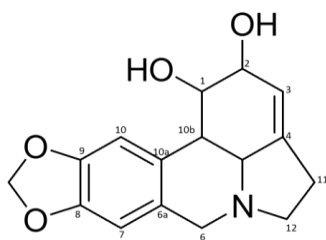
Os hidrogênios H-1 e H-2 aparecem mais desblindados, evidência de átomo eletronegativo ligado aos carbonos C-1 e C-2. Na ausência de metoxilas, foram atribuídos grupos hidroxila para essas posições, grupos comuns em alcaloides do tipo licorina. Os sinais observados para os hidrogênios  $\beta$  das posições 6 e 12 aparecem mais desblindados do que os seus homólogos  $\alpha$  devido a relação cis com o par de elétrons livres do átomo de nitrogênio do grupo NMe (BASTIDA, LAVILLA e VILADOMAT, 2006). A constante de acoplamento de 10,8 Hz observada entre H-4 $\alpha$  e H-10 $\beta$ , é sugestiva de acoplamento trans-diaxial, o que confirma a junção trans dos anéis B e C. Os dados de RMN  $^1\text{H}$  do desta substância foram comparados com a literatura (LIKHITWITAYAWUID, ANGERHOFER, CHAI et al., 1993; BASTIDA, LAVILLA e VILADOMAT, 2006), e concluiu-se que se tratava do alcaloide licorina (Figura 13).



**Figura 12:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **1** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz).

**Tabela 6:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  do composto **1** comparados com a literatura ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) (BASTIDA, 2006)

Hidrogênio	$\delta$ $^1\text{H}$	Licorina
H1	4,46 s	4,27 s
H2	4,16 s	3,97 s
H3	5,54 s	5,37 s
H4a	2,87 d (10,8)	2,60 d (10,6)
6 $\alpha$	3,53 dl (13,9)	3,32 d (14,4)
6 $\beta$	4,11 d (14,1)	4,02 d (14,4)
H7	6,64 s	6,68 s
H10	6,88 s	6,81 s
H10b	2,70 m	2,50 m
H11 $\alpha/\beta$	2,52 – 2,67 m	2,44 m
H12 $\alpha$	2,43 m	2,19 ddd (14,4; 8,6;1,5)
H12 $\beta$	3,33 m	3,19 dd (14; 4; 7; 5)
OCH <sub>2</sub> O	5,91 s e 5,90 s	5,94 s e 5,96 s

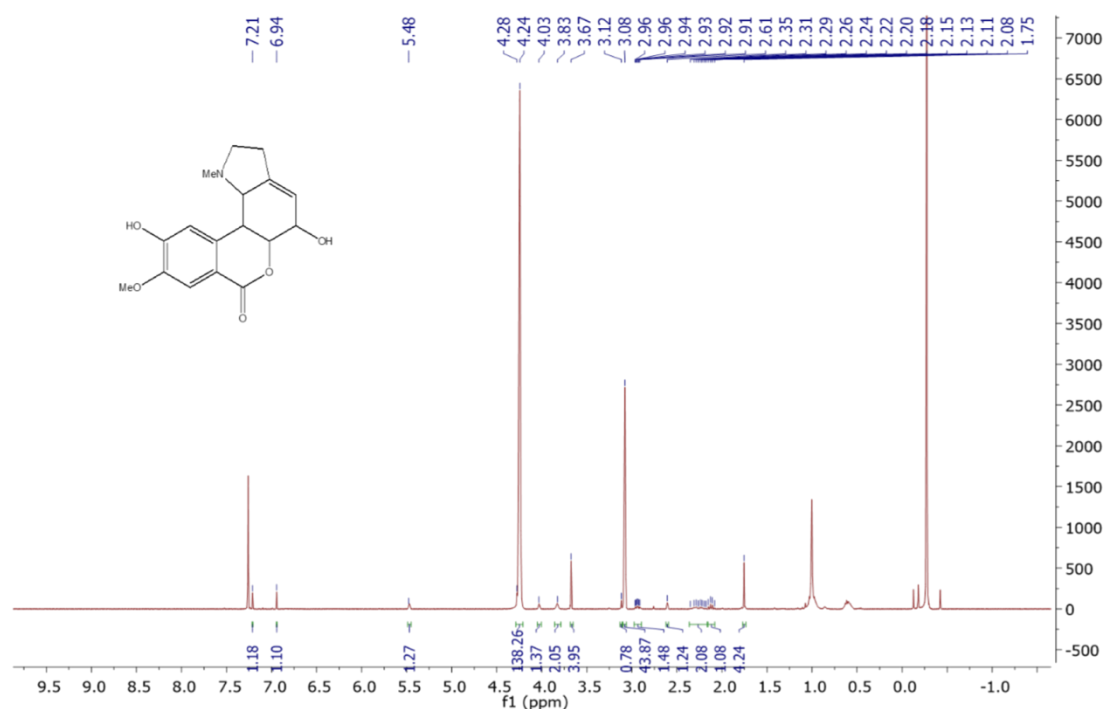


**Figura 13:** Estrutura química da Licorina

### 4.3.2 Composto 2

Foi observado no espectro de RMN  $^1\text{H}$  deste composto um sinpleto em  $\delta$  7,48 ppm e outro  $\delta$  7,21 ppm os dois integrando para 1H, característico de hidrogenio aromático. Apresenta um sinpleto em  $\delta$  5,74 ppm integrando para 1H em região de olefina. O espectro apresentou um duplete em  $\delta$  2,62 ppm representando o H4a. Um multiplete em  $\delta$  2,45 ppm e  $\delta$  2,62 ppm foi observado representando H11. Um singleto largo em 2,87 ppm na região de  $\delta$  2,02 aparece um sinal característico do grupo N-Metil e em  $\delta$  3,94 um sinpleto representando O-Metil. Há dois multipletos em  $\delta$  3,12 ppm e  $\delta$  2,35 que representam os hidrogênios do carbono 12, contudo o 12 $\alpha$  mais desblindado pois seus elétrons encontram-se em cis com o par de elétrons do nitrogênio. (BASTIDA, 2006), (Figuras 14 à 16).

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  e a comparação dos deslocamentos químicos com dados da literatura descrita (BASTIDA, 2006) (Tabela 7), permitiu a identificação dessa substância como sendo o alcaloide 9-O-desemetil-2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina (Figura 17).



**Figura 14:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 2 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

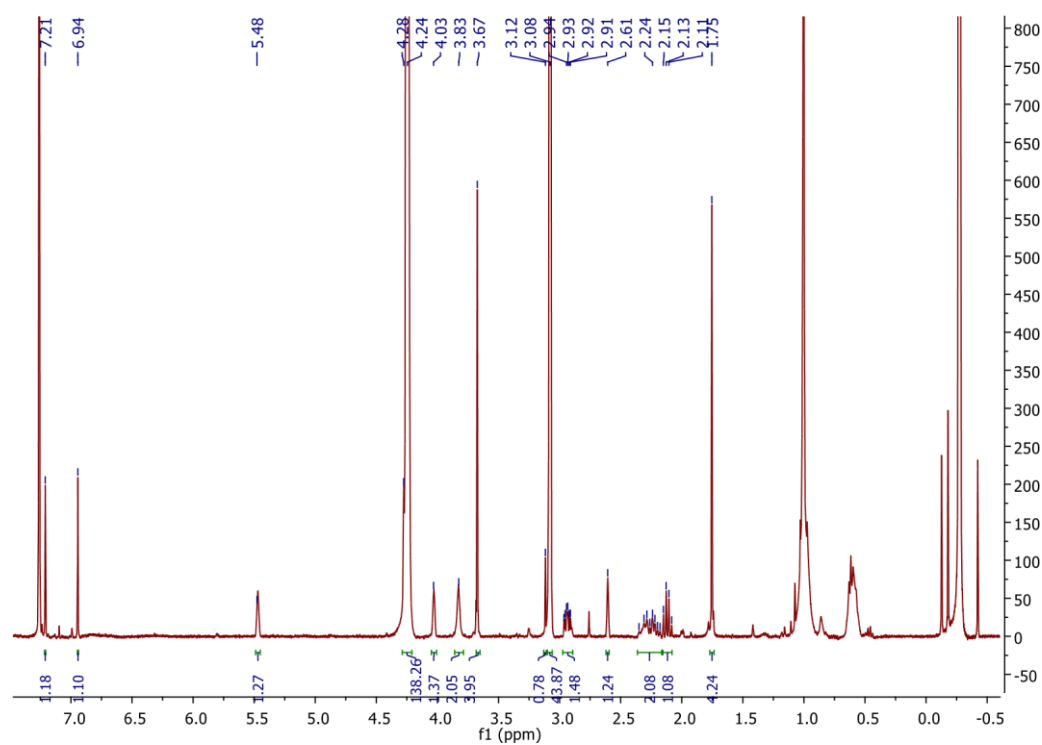


Figura 15: Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 2 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

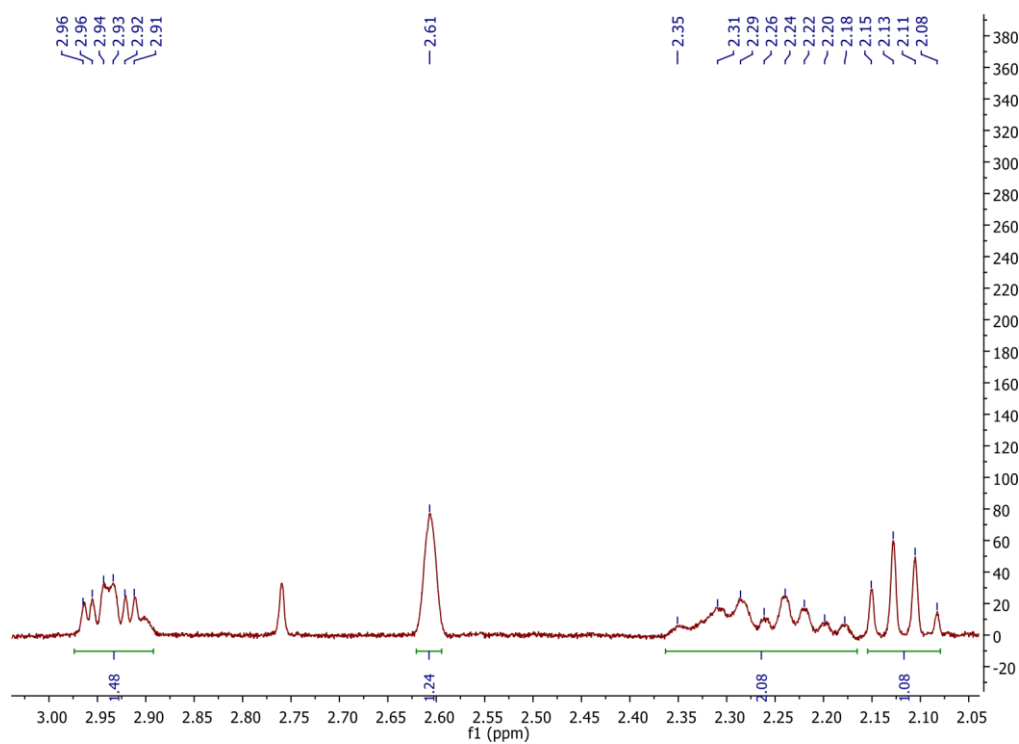
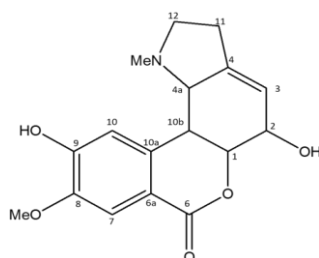


Figura 16: Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 2 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

**Tabela 7:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  do composto 2 comparados com a literatura ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) (BASTIDA, 2006)

Hidrogênio	$\delta$ $^1\text{H}$	9-O-desmetil-2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina
H1	4,54 d	4,59 d
H2	4,10 t	4,28 t
H3	5,74 s	5,68 s
H4a	2,62	2,66 d
H7	7,48 s	7,47 s
H10	7,21 s	6,95 s
H10b	2,87	2,83 dd
H11 (2H)	2,45-2,62	2,5-2,6 m
H12 $\alpha$	3,12 m	3,17 ddd
H12 $\beta$	2,35	2,31 dd
OMe	3,94 s	3,95 s
NMe	2,02 s	2,08 s

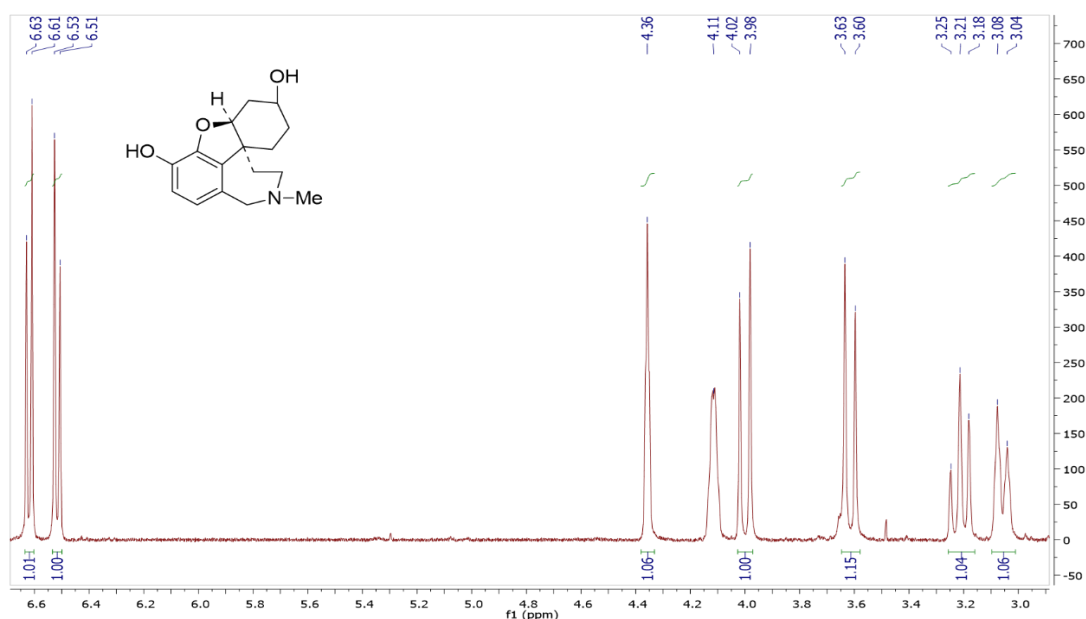


**Figura 17:** Estrutura da 9-O-desmetil-2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina.

### 4.3.3 Composto 3

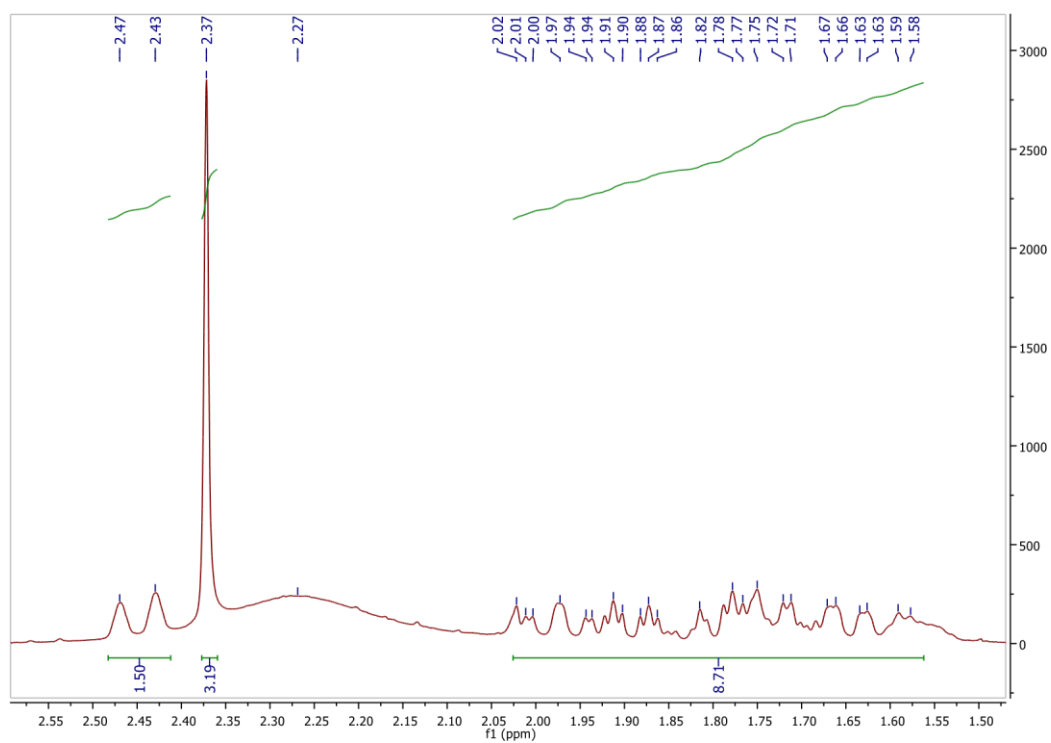
A partir da análise de RMN  $^1\text{H}$  do composto 3 foram observados dois dupletos na região de aromáticos em  $\delta$  6,62 ppm e  $\delta$  6,52 ppm os quais integram para um hidrogênio e apresentam constante de acoplamento de 8 ppm, esta constante de acoplamento é característica de hidrogênios aromáticos orto e meta orientados, como ocorre em alcaloides isoquinolínicos com esqueleto tipo galantamina (BASTIDA, 2006). Estes sinais correspondem à H-7 e H-8 respectivamente. O espectro apresenta um singlete em  $\delta$  4,36 ppm, e um multipeto em  $\delta$  4,12 ppm. Ambos integrando para 1 hidrogênio, correspondentes ao H-1 e H-3. O espectro também exibe um dupeto em  $\delta$  4,00 ppm e  $\delta$  3,62 ppm com  $J=15,2$ , indicando o acoplamento dos hidrogênios entre estes sinais correspondente à posição 6. Na região de  $\delta$  1,5 ppm e  $\delta$  2,00 ppm tem-se um multipeto referente aos sinais de H-2 $\alpha$ , H-4, H4a e H-11(2H). Um sinal integrando para 3 hidrogênios representado por um singlete na região de  $\delta$  2,30 ppm sugere a presença de um grupamento de NMe (Figuras 18 e 19).

A comparação dos deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  do composto 1 com dados da literatura (KIHARA et al, 1991) (Tabela 8), permitiu identificar essa substância como sendo o alcaloide 9-O-desmetillicoramina (Figura 20).



**Figura 18:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 3 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

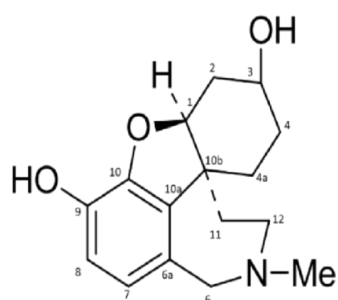




**Figura 19:** Ampliação do espectro de RMN  $^1\text{H}$  na região de 2,5 a 1,5 ppm do composto 3 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

**Tabela 8:** Comparação entre os deslocamentos químicos do composto 3 com os deslocamentos de 9-O-desmetillicoramina (KIHARA et al, 1991)

Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$	9-O-desmetillicoramina
H-1	4,36 s	4,36 m
H-2 $\alpha$	1,50 – 2,00 m	1,40 – 1,90 m
H-2 $\beta$	2,45 d	2,40 d
H-3	4,12 m	4,12 m
H-4	1,50 – 2,00 m	1,40 – 1,90 m
H-4 <sup>a</sup>	1,50 – 2,00 m	1,40 – 1,90 m
H-6	3,62 d (15,2)	3,58 d (15,0)
H-6'	4,00 d (15,2)	3,99 d (15,0)
H-7	6,62 d (8,0)	6,65 d (8,0)
H-8	6,52 d (8,0)	6,53 d (8,0)
H-11 (2H)	1,50 – 2,00 m	1,40 – 1,90 m
H-12 $\alpha$	2,98 d (15,4)	2,96 t
H-12 $\beta$	3,14 t (13,2)	3,12 t
NMe	2,30 s	2,37 s

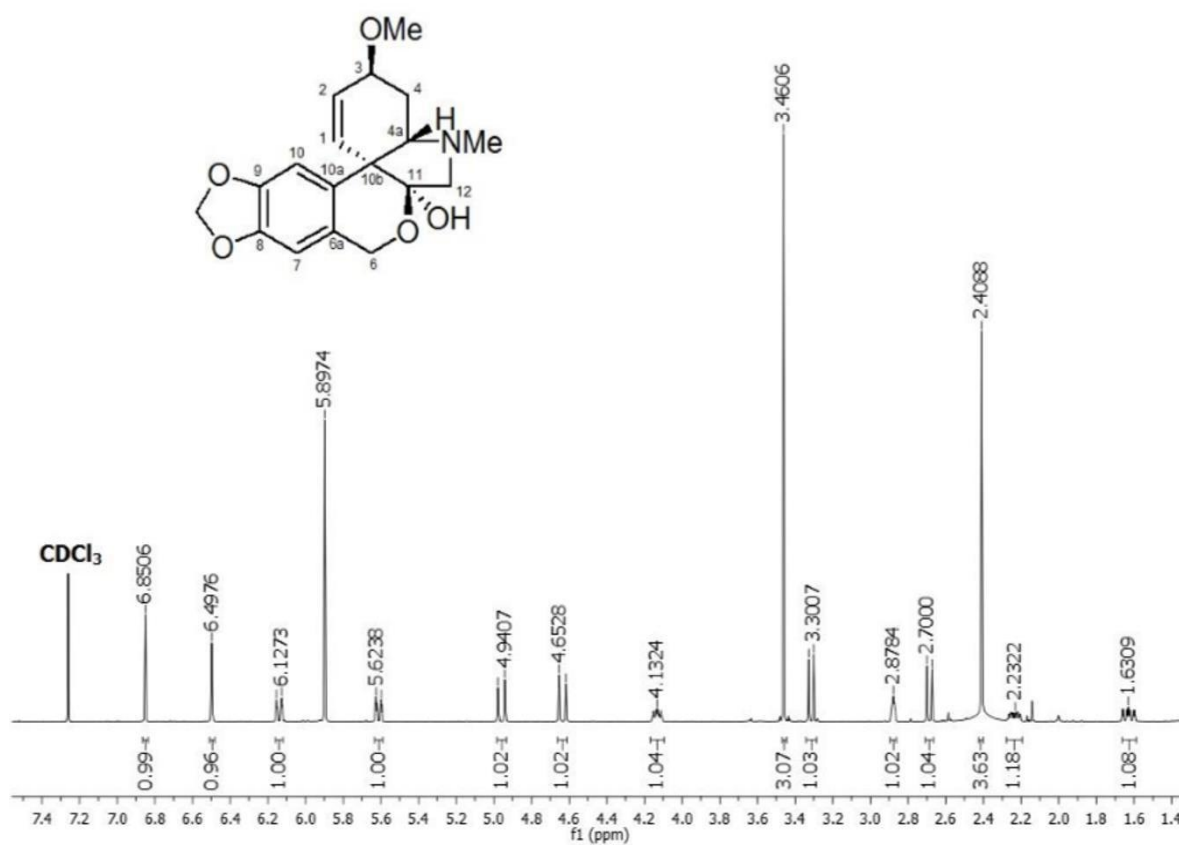


**Figura 20:** Estrutura da 9-O-desmetillicoramina.

#### 4.3.4 Composto 4

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 4 pode-se observar a presença dois hidrogênios sinpletos, em  $\delta$  6,85 ppm e  $\delta$  6,49 ppm, atribuídos aos hidrogênios H-10 e H7, respectivamente. Um sinal, integrando para três hidrogênios em  $\delta$  3,46 ppm, característico do grupamento OMe alifático e a presença de dois hidrogênios olefínicos, em  $\delta$  5,61 ppm, como um duplo duplo duplete, correspondente ao H-1, e em  $\delta$  6,14 ppm, como um duplo tripleto, correspondendo ao H-2. Os sinais dos hidrogênios da posição 12 aparecem como dupletos em  $\delta$  2,68 ppm e em  $\delta$  3,31 ppm, correspondente ao H-12 $\alpha$  H12 $\beta$  respectivamente. Eles acoplam entre si por uma constante de acoplamento de 10,6 Hz. Os hidrogênios benzílicos da posição 6 encontram-se em  $\delta$  4,63 ppm e  $\delta$  4,95 ppm, atribuídos aos H-6 $\alpha$  e H-6 $\beta$ , respectivamente. Além disto, é observado a presença do grupamento NMe entre  $\delta$  2,4 – 2,5 ppm, e do grupo metilenodioxifenila entre as posições C-8 e C-9 em alcaloides com esqueleto do tipo tazetina em seus espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , (BASTIDA et al, 2011) (Figura 21 e Tabela 9).

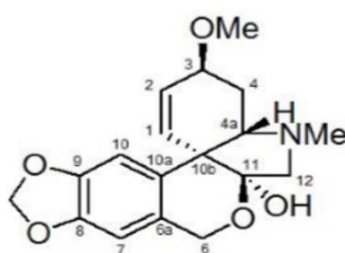
Após a análise do espectro deste composto, em comparação com dados da literatura, foi-se identificado o alcaloide tazetina (Figura 22) (GHOSAL et al, 1984).



**Figura 21:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **4** ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

**Tabela 9:** Deslocamentos dos hidrogênios em ppm do composto 4, e do alcaloide tazetina.

Hidrogênio	$\delta^1\text{H}$	Tazetina
H1	5,61 ddd (10,4; 1,9; 1,5)	5,60 ddd (10,5; 2; 1,5)
H2	6,14 dt (10,4; 1,5)	6,15 ddd (10,5; 2; 1,2)
H3	4,13 m	4,13 m
H4a	2,87 m	2,83 m
H4 $\alpha$	2,23 m	2,20 m
H4 $\beta$	1,62 ddd (13,6; 10,1; 2,4)	1,60 m
H6 $\alpha$	4,63 d (14,8)	4,65 d (14,7)
H6 $\beta$	4,95 dd (14,7; 0,6)	4,95 dd (14,7; 0,6)
H7	6,49 s	6,50 s
H10	6,85 s	6,85 s
H12 $\alpha$	2,68 d (10,6)	2,65 d (10,5)
H12 $\beta$	3,31 d (10,6)	3,30 d (10,5)
NMe	2,40 s	2,40 s
OCH <sub>2</sub> O	5,89 s	5,90 s



**Figura 22:** Estrutura da tazetina

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

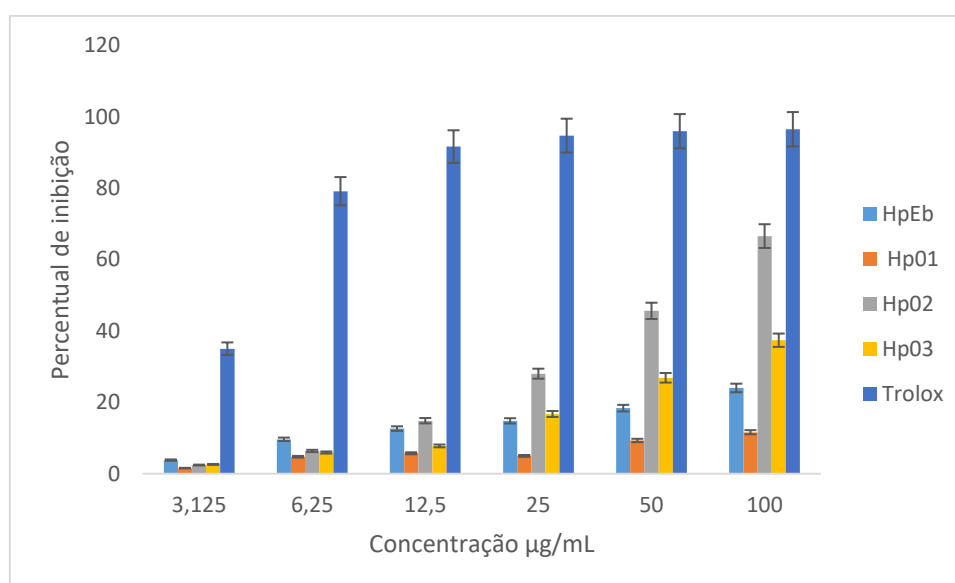
No organismo, os radicais livres desempenham várias funções, como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Mas, o excesso dos radicais livres pode acarretar em uma série de efeitos prejudiciais ao organismo, promovendo danos às membranas, podendo levar ao surgimento de câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas. Dessa forma é ideal que o excesso dos radicais livres seja combatido por substâncias antioxidantes. Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante de extratos e substâncias de plantas, de formas a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes. Dentre estes métodos destaca-se o sistema de sequestro de radicais livres sintéticos, tais como os testes com DPPH e ABTS (ZANCA, 2015). Diversos alcaloides de Amaryllidaceae possuem atividade antioxidante, estudos preliminares identificaram a atividade antioxidante promissora em *H. morelianum*, *H. psittacinum* e *H. santacatarina*, (GIORDANI et al., 2008).

##### 4.4.1 Ensaio de captura do radical DPPH

Os resultados do ensaio de captura do radical DPPH foram analisados por ANOVA de uma via com pós hoc de Tukey e comparados com o controle positivo, o TROLOX. A amostra Hp02 foi a que apresentou maior potencial antioxidante dentre as análises realizadas, o que pode ser observado na Tabela 10 e no gráfico da Figura 23, onde estão representadas todas as médias da porcentagem de inibição de todas as amostras analisadas e do padrão, o TROLOX. Todas as amostras nas concentrações analisadas não apresentam similaridade de acordo com a porcentagem de inibição do radical em questão ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 10:** Dados da porcentagem de inibição dos extratos em diferentes concentrações no ensaio de captura do radical DPPH

Concentração (µg/mL)	3,125	6,25	12,5	25	50	100
Amostra						
HpEb	3,79%	9,61%	12,61%	14,78%	18,34%	23,99%
Hp01	1,54%	4,72%	5,69%	4,97%	9,29%	11,60%
Hp02	2,40%	6,35%	14,82%	27,99%	45,59%	66,53%
Hp03	2,57%	5,91%	7,76%	16,71%	26,84%	37,36%
Trolox	35,00%	79,10%	91,59%	94,68%	95,91%	96,45%



**Figura 23:** Resultado de captura do radical DPPH por HpEb, Hp01, Hp02, Hp03 e TROLOX.

Neste trabalho a atividade antioxidante com o ensaio de DPPH, foi verificada que apenas Hp02 apresenta capacidade antioxidante significativa. Isto pode estar relacionado à presença de alcaloides nesta fração, uma vez que dentre eles encontra-se a licorina, cuja ação antioxidante já é comprovada.

Os extratos HpEb, Hp01 e Hp03 não demonstraram atividade antioxidante significativa neste ensaio.

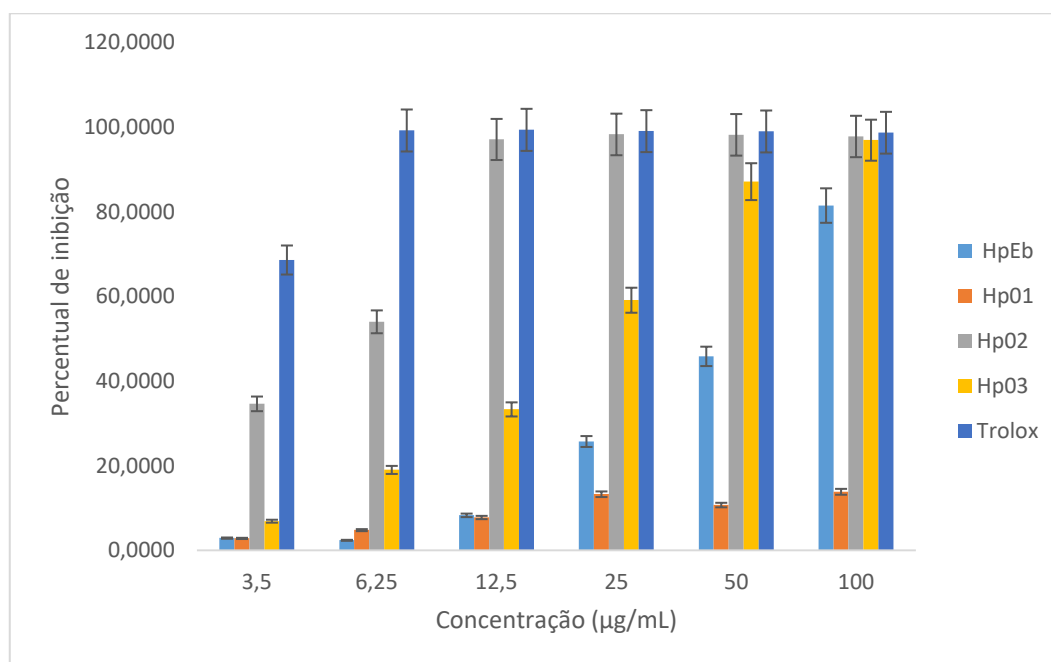
#### 4.4.2 Ensaio de captura do radical ABTS

Os resultados do ensaio de captura do radical ABTS foram significativos para a amostra Hp02 (nas concentrações de 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL) e Hp03 (na concentração de 100 µg/mL) ( $p < 0,05$ ). Contudo, as amostras HpEb e Hp01 não apresentaram atividade antioxidante significativa ( $p > 0,05$ ). A Tabela 11 e Figura 24 representam os valores das médias dos resultados do ensaio de cada amostra e do TROLOX.

**Tabela 11:** Dados da porcentagem de inibição dos extratos em diferentes concentrações no ensaio de captura do radical ABTS

Concentração (µg/mL)	3,125	6,25	12,5	25	50	100
Amostra						
HpEb	2,92%	2,40%	8,30%	25,75%	45,87%	81,50%
Hp01	2,85%	4,81%	7,79%	13,29%	10,73%	13,87%
Hp02	34,65%	54,03%	97,12%	98,30%	98,21%	97,82%
Hp03	6,92%	19,03%	33,33%	59,13%	87,15%	96,95%
trolox	68,63%	99,24%	99,39%	99,09%	99,01%	98,71%





**Figura 24:** Representação da média da porcentagem de inibição dos resultados dos ensaios de captura do radical ABTS.

No ensaio de captura com o radical ABTS, foi constatado que Hp02 possui similaridade com o padrão em concentrações menores, a partir de 12,5 µg/mL, o que demonstra a presença de grande capacidade antioxidante nesta fração. Todavia, neste ensaio também foi identificado resultado significativo ( $p < 0,05$ ) para o HpEb, Hp01 e Hp03 na concentração de 100 µg/mL, uma vez que este teste é mais sensível.

É possível que a atividade antioxidante em Hp02 seja proveniente da presença de alcaloides, uma vez comprovada a atividade antioxidante de diversos alcaloides de Amaryllidacea (GIORDANI et al., 2012; GIORDANI et al., 2008; CARVALHO et al., 2015) e este extrato possui maior teor de alcaloides em relação aos outros analisados. Contudo, uma vez que outras frações também apresentam uma certa atividade antioxidante, não se pode descartar a provável presença de outros compostos antioxidantes nestes extratos, principalmente os compostos fenólicos (GUTIERREZ, 2013; LI et al., 2014), uma vez que a fração Hp03 não foi detectado a presença de alcaloides e possui atividade antioxidante significativa quando submetida ao teste de captura do radical ABTS.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TROMBOLÍTICA

A análise estatística dos resultados identificou que há diferença na capacidade das amostras em lisar os coágulos. Os resultados encontram-se representados na tabela 12.

**Tabela 12:** Resultado da avaliação da atividade trombolítica.

Amostras	Lise dos coágulos (% $\pm$ desvio padrão)	Valor de p quando comparado à estreptoquinase
HpEb	21,70 $\pm$ 6,04	< 0.05
Hp01	13,64 $\pm$ 4,45	< 0.05
Hp02	6,87 $\pm$ 1,70	< 0.05
Hp03	10,34 $\pm$ 8,43	< 0.05
Água	2,79 $\pm$ 3,22	
Propilenoglicol 10%	3,76 $\pm$ 3,03	
Estreptoquinase 100000UI	50,12 $\pm$ 9,23	

O ensaio para detectar a atividade trombolítica de extratos vegetais busca a obtenção de novas moléculas que possam ser utilizadas como alternativa ao tratamento usual, bem como para serem utilizadas concomitantemente aos mesmos com o objetivo de potencializar o tratamento do paciente. O uso clínico dos fármacos fibrinolíticos usuais têm sido alvo de inúmeras discussões devido à inúmeras restrições clínicas. Dentre elas, pacientes com idade superior a 65 anos, com prévia ressuscitação cardiorrespiratória e em indivíduos diabéticos, e também devido a riscos terapêuticos de hipotensão e acidente vascular hemorrágico cerebral (LANGER; WOLOSKEWICZ, 2006; OLIVEIRA, 2001; WOOD et al., 1997). O teste de atividade trombolítica para os

extratos HpEB, Hp01, Hp02 e Hp03 não apresentou resultados estatisticamente significativos se comparados ao fármaco estreptoquinase.

## CONCLUSÃO

O estudo químico indicou a presença de diversas classes de metabólitos secundários, como flavonoides, cumarinas, taninos, triterpenos e alcaloides. Foram isolados e/ou identificados quatro compostos da classe dos alcaloides isoquinolínicos, a 9-O-desmetillicoramina, a licorina e a 9-O-desmetil-2- $\alpha$ -hidroxihomolicorina e tazetina. A 9-O-desmetil-2 $\alpha$ -hidroxihomolicorina pertence ao grupo das homolicorinas. A licorina e a tazetina pertencem ao grupo do esqueleto tipo de mesmo nome. A 9-O-desmetillicoramina foi isolada pela primeira vez pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Produtos Naturais da UFES e pertence ao grupo do esqueleto tipo galantamina. Porém, tendo em vista a escassez de ensaios biológicos com a 9-O-desmetillicoramina, esta apresenta-se como promissor alvo biológico.

O extrato bruto e as frações de *Hippeastrum puniceum* não apresentaram atividade trombolítica. Contudo, a fração Acetato de Etila, de *Hippeastrum puniceum*, apresentou atividade antioxidante frente a radicais sintéticos, que pode estar relacionada ao alto teor de alcaloides presentes na mesma, direcionando a continuidade da avaliação dessa atividade frente a espécies reativas de interesse biológico. O extrato bruto metanólico e a fração Acetato de Etila:Metanol (3:1) também apresentaram atividade antioxidante significativa, porém apenas em elevadas concentrações.

Os resultados obtidos demonstram o progresso no estudo fitoquímico de *Hippeastrum puniceum*, no entanto se faz necessário a busca de outras metodologias para avaliar o potencial biológico de *Hippeastrum puniceum*.

## REFERÊNCIAS

AMARAL, Andrielle Câmara. Amaryllidaceae Jaume St.-Hil.: levantamento das espécies do Distrito Federal, Brasil, e estudos de multiplicação in vitro. 2007. Dissertação (mestrado Programa de Pós-graduação em Botânica. UNB - Universidade de Brasília Instituto, Brasília, 2007)

AMARAL, L. A produção de Amarílis no mercado brasileiro de flores. **Bioikos**, 20, 71-74, 2006.

ANDRADE, J. P. de Análise química e biológica em alcaloides do gênero Hippeastrum (Amaryllidaceae), 102 p.: il., graf., tab. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. UFRGS, Porto Alegre, 2007.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. da Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos, **Química Nova**, V. 32, n. 3, 679-688, 2009.

BASTIDA, J. et.al. Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. In: D. MUNOZ-TORRERO (Ed.), Recent Advances in Pharmaceutical Sciences Kerala, India: **Transworld Research Network**, p. 65-100, 2011.

BASTIDA, Jaume et al. 9-O-Demethyl-2 $\alpha$ -hydroxyhomolycorine, an alkaloid from Narcissus tortifolius. **Phytochemistry**, v. 29, n. 8, p. 2683-2684, 1990.

BERKOV, S.; et al. Antiproliferative alkaloids from Crinum zeylanicum. **Phytother. Res.**, 25, 1686-1692, 2011.

BESSA, C. D. P. B.; de ANDRADE, J. P.; OLIVEIRA, R. S.; DOMINGOS, E.; SANTOS, H.; ROMÃO, W.; BASTIDA, J.; BORGES, W. S.; Identification of alkaloids from Hippeastrum aulicum (ker Gawl.) Herb. (Amaryllidaceae) using

CGC-MS and ambiente ionization mass spectrometry (OS-MS and LS-MS). **Journal of Brazilian Chemical Society**. V. 00 p. 1-12, 2016.

CANDIDO, R. S. et al. Hippeastrum species in areas of resting in the state of Rio de Janeiro, Brazil: pollen characters. **Acta Bot. Bras.**, 27, 661-668, 2013.

CANDIDO, R. S.; FOURNY, A. C. S.; GONÇALVES-ESTEVEZ, V.; LOPES, R. C., *Hippeastrum* species in areas of resting in the state of Rio de Janeiro, Brazil: pollen characters, *Acta Bot. Bras.*, **27**, 661-668, 2013.

CARVALHO, K. R.; SILVA, A. B.; TORRES, M. C. M.; PINTO, F. C. L.; GUIMARÃES, L. A.; ROCHA, D. D.; SILVEIRA, E. R.; COSTA-LOTUFO, L. V.; BRAZ-FILHO, R.; PESSOA, O. D. L. Citotoxic alkaloids from *Hippeastrum solandriflorum* Lindl. **Journal of Brazilian Chemical Society**. V. 26, p. 1876-1980, 2015.

CEDRÓN, J. C. et al. Chemistry and biology of *Pancratium* alkaloids. **The Alkaloids: Chemistry and Biology**, v. 68, p. 1-37, 2010.

CHASE, M. W.; REVEAL, J. L.; FAY, M. F., A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae., *Bot. J. Linn. Soc.*, **161**, 132-136, 2009.

COOK, J. W.; LOUDON, J. D. The Alkaloids. Manske R. H. F. e Holmes H. L. (ed), New York: **Academic Press**, v. 2, p. 331.1952.

CORDELL, G. A. (Ed), Chemistry and Physiology. San Diego: **Academic Press INC.**, v.63, cap.3, p.87-179. 2006.

CORTES, N. et al. Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five Amaryllidaceae plants. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 102, p. 222-228, 2015.

de ANDRADE, J. P. et al. Alkaloids from the Hippeastrum genus: Chemistry and Biological activity. **Revista Latinoamerica de Química**, v. 40, p. 25. 2012.

de ANDRADE, J. P. et al. Alkaloids from Hippeastrum papilio. **Molecules**, 16, 7097-7104, 2011.

DELBONE, C. A. C. **Importância ecológica e evolutiva dos principais grupos de metabólitos secundários nas espécies vegetais**. UENP – Universidade Estadual do Norte do Paraná – Centro de Ciências Humanas e da Educação e Centro de Letras e Comunicação e Artes. Paraná, 2010. p.396 – 404.

DEMAIN, A. L. e FANG, A. The natural functions of secondary metabolites. History of Modern Biotechnology. **Advances in Biochemical Engineering/Biotecnology**. v. 69, p. 1-39, 2000.

DUTILH, J. H. A. Ornamental Bulbous Plants of Brasil. **Acta Hort.** (ISHS), 683, 37-42, 2005.

DUTILH, J.H.A.; OLIVEIRA, R.S. Amaryllidaceae in: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB129639>>. Acesso em: 12 de maio de 2016.

ELGORAGHI, E. E.; STAFFORD, G. I.; VAN STADEN, J. Acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. **Planta médica**, v.70, n.3, p.260 – 262, 2004.

ELGORASHI, E.E. e STADEN, J. van. Pharmacological screening of six Amaryllidaceae species. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, p.27-32, 2004.

FENG, T. et al. Amaryllidaceae alkaloids from *Lycoris radiata*. **Helv. Chim. Acta**, 94, 178-183, 2011.

GHOSAL, S.; SAINI, K. S.; RAZDAN, S. Crinum alkaloids: their chemistry and biology. **Phytochemistry**, 24, 2141-2156, 1985.

GIORDANI, R. B. et al. Candimine-induced cell death of the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. **J. Nat. Prod.**, 73, 2019-2023, 2010.

GIORDANI, R. B.; PAGLIOSA, L. B.; HENRIQUES, A. T.; ZUANAZZI, J. A. S.; DUTILH, J. H. A. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). **Quim. Nova**, 31, 2042-2046, 2008.

GIORDANI, R. B. et al. Alkaloids from *Hippeastrum morelianum* Lem. (Amaryllidaceae). *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 49, n. 10, p. 668672, 2011.

GUDE, M., HAUSEN, B. M.; HEITSCH, H.; KONG, W. A., An investigation of the irritant and allergenic properties of daffodils (*Narcissus pseudonarcissus* L., Amaryllidaceae). A review of daffodil dermatitis, *Contact Dermatitis*, **19**, 1-10, 1988.



GURIB-FAKIM, A. Tradition sofy esterday and drugs of tomorrow, *Molecular Aspectsof Medicine*, v.27, p.1-93.2006.

HOUGHTON, P. J.; REN, Y.; HOWES, M-J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Nat. Prod. Rep.**, 23, 181-199, 2006.

JIN, Z. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids, **Natural Products Reports**, v. 30, p. 849–868, 2013.

JIN, Z. Amaryllidaceae and *Sceletium* alkaloids, *Natural Products Reports*, **26**, 363–381, 2009.

KATO, M. J. Global phytochemistry: the Brazilian approach, **Phytochemistry**, v. 57, p. 621-623.2001.

KIHARA, M.; KONISHI, K.; XU, L.; KOBAYASHI, S. Alkaloidal Constituents of the Flowers of *Lycoris radiata* Herb. Amaryllidaceae. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 39, n. 7, p. 1849-1853, 1991.

LI, W. et al., Anti-inflammatory and antioxidant activities of phenolic compounds from *Desmodium caudatum* leaves and steams. **Archives of Pharmaceutical Research**, v. 37. n. 6, p. 721 – 727, 2014.

LIKHITWITAYAWUID, K.; et al. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the bulbs of *Crinum amabile*. *J. Nat. Prod.*, 56, 1331-1338, 1993.

LORENZI, H. e MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas. Nova Odessa: **Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA**. 512p, 2002.

MAELICKE, A. et al. Allosteric Sensitization of Nicotinic Receptors by Galantamine, a New Treatment Strategy for Alzheimer's Disease. **Biological Psychiatry**, v. 49, n. 3, p. 279-288, 2001.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MIKAMI, M., et al. Suppressive activity of lycoricidinol (narciclasine) against cytotoxicity of neutrophil-derived calprotectin, and its suppressive effect on rat adjuvant arthritis model. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 22, n. 7, p. 674-678, 1999.

NOGUEIRA, L. J.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Histórico da evolução da química medicinal e a importância da lipofilia: de Hipócrates e Galeno a Paracelsus e as contribuições de Overton e de Hansch, **Revista Virtual de Química**, 2009, v. 1, n. 3, 227-240. Disponível em: <https://pt.scribd.com/doc/207860870/Historia-e-lipofilicidade-pdf>. Acesso em: 18 abril 2016.

OLIVEIRA, C. C. Trombolíticos. **Revista da SOCERJ**, v. 14, n. 1, p. 47 – 52, 2001.

OLIVEIRA, S. O. de; SEMIR, J.; DUTILH, J. H. A. Four new endemic species of *Hippeastrum* (Amaryllidaceae) from Serra da Canastra, Minas Gerais State, Brazil, **Phytotaxa**, v.145, n.1, p. 38-46. 2013.

PAGLIOSA, L. B. et al. Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on in vitro acetylcholinesterase activity, **Phytomedicine**, v. 17, p. 698-701, 2010.

PETTIT, G. R. et al. Antineoplastic agents, 120. *Pancratium littorale*, **Journal of Natural Products**, v.49, n.6, p. 995-1002.1986 .

PETTIT, G., et al. Synthesis of 10b (R)-hydroxypancratistatin, 10b (S)-hydroxy-1-epipancratistatin, 10b (S)-hydroxy-1, 2-diepipancratistatin and related isocarbostyrils. **Heterocycles**, v. 56, n. 1-2, p. 139-155, 2002.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, s. 1, p. 45-61, 2002.

QUIRION, J. C., et al. (-) -3-O-Acetylnarcissidine, a New Alkaloid from *Hippeastrum puniceum*. *Journal of natural products*, v. 54, n. 4, p. 1112-1114, 1991.

SANTANA, Omar et al. 3-O-Acetyl-narcissidine, a bioactive alkaloid from *Hippeastrum puniceum* Lam.(Amaryllidaceae). **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 63, n. 9-10, p. 639-643, 2008.

SILVA, A. F. S. da. *Hippeastrum vittatum* (L'her) Herbert e *Hippeastrum striatum* (Lam.) Moore: Análise química e avaliação biológica dos alcaloides isolados, 2006. Tese (doutorado). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2006.

SILVA, A. F. S. et al. Anxiolytic, antidepressant- and anticonvulsant like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 85, 148-154, 2006.

SIMÕES, C. M. O. e SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. Maringá: **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 12, vol.12 n. 1, p.35-40, 2002.

SONAGLIO, D. et al., Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: Simões, C. M. O. et al., (Orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2007. p. 289 – 323.

STROHL, W. R. The role of natural products in a modern drug discovery program, **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 2, p. 39–41.2000.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WENIGER, B.; ITALIANO, L.; BECK, J. P.; BASTIDA, J.; BERGONON, S.; CODINA, C.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Cytotoxic activity of Amaryllidaceae alkaloids, *Planta Medica*, **61**, 77-79, 1995.

ZANCA S. S.; NUNEZ, C. V. **Análise Fitoquímica Sazonal e Cultura de Tecidos *In Vitro* de *Duroiamacrophylla* Huber**. INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – Centro de Coordenação de Tecnologia e Inovação. Amazonas, 2015.

ZHAN, G. et al. Galanthamine, Plicamine, and Secoplicamine Alkaloids from *Zephyranthes candida* and Their Anti-acetylcholinesterase and Anti-inflammatory Activities. **Journal of natural products**, v. 79, n. 4, p. 760-766, 2016.



## ANEXO – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE/UFES



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo biomonitorado com ênfase na atividade trombolítica de extratos vegetais, frações e substâncias isoladas de espécies vegetais brasileiras

**Pesquisador:** Claudia Masrouah Jamal

**Área Temática:** Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

**Versão:** 2

**CAAE:** 07431812.6.0000.5060

**Instituição Proponente:** Centro de Ciências da Saúde ((CCS-UFES))

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 148.873

**Data da Relatoria:** 28/11/2012

#### Apresentação do Projeto:

A investigação caracteriza-se por um estudo biomonitorado de espécies vegetais, de caráter multidisciplinar, que utiliza a abordagem etnobotânica/etnomedicinal na expectativa de avaliar a possível atividade trombolítica de extratos vegetais, frações e moléculas potencialmente úteis na terapêutica.

#### Objetivo da Pesquisa:

O objetivo da pesquisa é avaliar as atividades antioxidante e trombolítica de extratos vegetais, frações e substâncias isoladas de espécies vegetais brasileiras.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo hipótese da pesquisa, o isolamento de compostos responsáveis pela atividade trombolítica por determinada espécie, além de corroborar, em uma base científica, o uso popular de determinada planta, fornece subsídios valiosos para a modelagem de novos fármacos estruturalmente e biologicamente semelhantes àquele de origem natural.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto apresenta uma considerável fundamentação teórica, bibliográfica e metodológica não carecendo de ulteriores observações por parte do Colegiado. As alterações sugeridas no parecer

**Endereço:** Av. Marechal Campos 1468

**Bairro:** S/N

**UF:** ES

**Telefone:** (27)3335-7211

**Município:** VITORIA

**CEP:** 29.040-091

**E-mail:** cep.ufes@hotmail.com ; cep@ccs.ufes.br

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE/UFES**

anterior foram realizadas pela pesquisadora.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

A hipótese de pesquisa é promissora visto que poderá fornecer subsídios valiosos para a modelagem de novos fármacos no combate do tromboembolismo. Os objetivos do estudo são claros, a metodologia é pertinente e o TCLE apresenta um razoável detalhamento das informações a serem transmitidas e coletadas pelos participantes da pesquisa.

**Recomendações:**

Sem ulteriores recomendações

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências ou inadequações.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

VITORIA, 20 de Novembro de 2012

---

**Assinador por:**  
**Adauto Emmerich Oliveira**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Marechal Campos 1468

**Bairro:** S/N

**UF:** ES

**Município:** VITORIA

**Telefone:** (27)3335-7211

**CEP:** 29.040-091

**E-mail:** cep.ufes@hotmail.com ; cep@ccs.ufes.br